



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LILIAN GONÇALVES DOS REIS BASTOS

Progênie derivadas de células de câncer colorretal que sobrevivem à radioterapia apresentam um aumento do potencial migratório e invasivo e desenvolvem um fenótipo *EMT-like*

Orientador (es): Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

**RIO DE JANEIRO
2014**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LILIAN GONÇALVES DOS REIS BASTOS

Progênes derivadas de células de câncer colorretal que sobrevivem à radioterapia apresentam um aumento do potencial migratório e invasivo e desenvolvem um fenótipo *EMT-like*

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientador (es): Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

**RIO DE JANEIRO
2014**

B327p Bastos, Lilian Gonçalves dos Reis.

Progênies derivadas de células de câncer colorretal que sobrevivem à radioterapia apresentam um aumento do potencial migratório e invasivo e desenvolvem um fenótipo EMT-like. / Lilian Gonçalves dos Reis Bastos. – Rio de Janeiro, 2014.

109 f.: il.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientador: José Andrés Morgado Díaz.

1. Neoplasias Colorretais – Genética. 2. Neoplasias Colorretais - Radioterapia. 3. Glicosilação. I. Morgado Díaz, José Andrés. II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.99435



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LILIAN GONÇALVES DOS REIS BASTOS

**PROGÊNIES DERIVADAS DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL QUE
SOBREVIVEM À RADIOTERAPIA APRESENTAM UM AUMENTO DO
POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO E DESENVOLVEM UM FENÓTIPO
EMT-LIKE**

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz

Aprovada em: 16/04/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Cláudia Vitória de Moura Gallo
Prof. Dr. Raquel Ciuvalschi Maia
Prof. Dr. Sheila Coelho Soares Lima
Prof. Dr. Thereza Cristina Barja Fidalgo
Prof. Dr. Helena Lobo Borges (Suplente)
Prof. Dr. Mauro Sérgio Gonçalves Pavão (Suplente)

RIO DE JANEIRO

2014

DEDICATÓRIA

Dedico esta Tese aos meus Pais, ao Marcus, à minha querida Vovó Nair, e ao Vovô Luiz, que depois de 100 anos de vida, passou a ser uma estrela.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por iluminar o meu caminho;
- Aos meus queridos e amáveis Pais, pelo trabalho sem medir esforços, apoio e incentivo para a nossa formação; e aos meus irmãos "cabeças" pelo apoio constante nessa trajetória;
- Ao meu esposo, companheiro, amigo, namorado, Marcus, pela imensa paciência ao longo de todo esse período da minha vida de pós graduação, TPMs, incertezas e etc... E pelo amor incondicional;
- À Marlú e Dê, as quais sempre serei grata em toda a minha vida por terem me amparado com tanto carinho ao longo da graduação na UFJF e, portanto, contribuíram imensamente para que eu chegasse até aqui;
- À Walquíria (*in memorian*) pelo exemplo e por ter aflorado o gosto pelo curso de Farmácia e Bioquímica;
- À toda a minha família, Mineira...de alma boa... e comida boa também!
- À Rosana e Lauro, meus Sogros queridos pelo imenso apoio e incentivo sempre;
- Ao Prof. José Morgado que aceitou me orientar num momento crucial da minha vida e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse Grupo tão especial;
- A Priscila Marcondes, minha primeira e querida aluna de IC, a qual contribuiu de maneira extremamente ativa em todas as etapas desse trabalho;
- Aos demais integrantes do Laboratório de Biologia Estrutural, pelo extremo companheirismo, trocas de conhecimentos, discussões e conselhos científicos... Conselhos para a vida! Pelas nossas farras (que são muito boas!) e por serem pessoas tão especiais de caráter, de humildade e de amizade, afinal, depois de tanto tempo de convivência, TODOS nós temos a certeza de que não foi somente um ambiente de trabalho, mas sim, a formação da Família BIOEST, com elos para a vida toda!
- Aos amigos do 5º andar pelas conversas super "polêmicas" na copa e aos amigos do IPA, pelas noites mal dormidas decorrente de tanto trabalho e pelas novas amizades formadas;
- Aos alunos e Orientadores do IPATIMUP, por me receberem tão bem, e em especial à Sandrinha, que me acompanhou ao longo de todo o tempo que estive por lá;
- Às amigas Isis e Helaine, pelo incentivo científico desde sempre;
- E finalmente, aos amigos cariocas, paulistas e "razados" de Santa, pelo incentivo, alegria, amizade e pelos muitos momentos de felicidade!!! Afinal, o que importa, é isso. Ser feliz!

"...Perhaps an appropriate symbolic representative of the stem-cell origin of cancers is Shiva, the Hindu god of both creation and destruction. He has the power of a progenitor, like a stem cell. Yet he is also capable of destroying everything he has created, like a malignant cell..."

Shi-Ming Tu,
The University of Texas ,M. D. Anderson Cancer Center



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

PROGÊNIES DERIVADAS DE CÉLULAS DE CÂNCER COLORRETAL QUE SOBREVIVEM À RADIOTERAPIA APRESENTAM UM AUMENTO DO POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO E DESENVOLVEM UM FENÓTIPO EMT-LIKE

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Lilian Gonçalves dos Reis Bastos

A radioterapia constitui uma das principais terapias adjuvantes para o tratamento de câncer colorretal em pacientes com estadiamento avançado. Porém, o esquema de fracionamento de doses pode permitir a repopulação de células tumorais sobreviventes ao tratamento e o reaparecimento do tumor, a progressão tumoral e a ocorrência de metástases tardias. Neste estudo, foram analisados os efeitos transgeracionais induzidos pela radioterapia na progênie derivadas de células de câncer colorretal sobreviventes ao tratamento e avaliado o quanto a radiação poderia induzir um fenótipo mais agressivo nessas progênies. Os resultados mostraram que essas células apresentam uma radiorresistência diferencial entre si, e que as células mais radiorresistentes formam progênies com aumento da expressão da proteína survivina, aquisição de uma morfologia aberrante, desorganização das junções celulares e do citoesqueleto de actina. Também foi observado que a progênie derivada de células HT-29 sobreviventes à radiação apresentam um aumento do potencial migratório invasivo, bem como um aumento da atividade de TCF-LEF, seguido do aumento da expressão de marcadores mesenquimais e redução de E-caderina. Assim, componentes da via de sinalização Wnt/ β -catenina podem constituir importantes alvos para novos esquemas terapêutico em combinação com a radioterapia, com o intuito de reduzir o potencial migratório e invasivo das células remanescentes ao tratamento com radiação. Adicionalmente, essas progênies mais invasivas apresentaram um aumento do perfil global de *N*-glicosilação, bem como suas moléculas de E-caderina remanescentes hiperglicosiladas. Portanto, alterações no perfil de glicosilação podem ser importantes modificações pós-traducionais envolvidas no processo de aquisição do fenótipo EMT-like desenvolvido após o tratamento com radioterapia. Juntos, esses resultados mostraram que células que sobrevivem à radioterapia podem dar origem a progênies com fenótipo EMT-like que são altamente agressivas e invasivas, as quais podem ser responsáveis pela progressão do câncer relacionada à radiorresistência após o tratamento com a radiação.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**PROGENY DERIVED FROM IRRADIATED COLORECTAL CANCER CELLS
ACQUIRE AN EMT-*LIKE* PHENOTYPE THAT CORRELATES WITH
MIGRATORY AND INVASIVENESS POTENTIALS.**

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Lilian Gonçalves dos Reis Bastos

Radiotherapy remains a major approach to adjuvant therapy for patients with advanced colorectal cancer. However, radiotherapy fractionation schedules frequently allow for the repopulation of surviving tumors cells and tumor recurrence, neoplastic progression and subsequent metastasis. In this study, we analyzed the transgenerational effects induced by radiation on the progeny derived from irradiated parental cells of colorectal cancer and evaluated whether the radiation could increase the malignant features of radiotherapy-survivors cells. Our results showed that these cells displayed a differential radioresistance and that the most radioresistant progeny had a direct correlation with increased survivin expression, acquisition of an aberrant morphology, disturbance of the cell-cell adhesion contacts and actin cytoskeleton disorganization. We also observed that the progeny that were derived from irradiated HT-29 cells displayed an increased migratory and invasiveness potential as well as increased Wnt/ β -catenin-dependent TCF/LEF activity followed by an upregulation of mesenchymal markers and downregulation of E-cadherin. Therefore, the components of the Wnt/ β -catenin cell signaling pathway may constitute important targets for new adjuvant treatment schedules with radiotherapy, with the goal of reducing the migratory and invasive potential of the remaining cells after radiotherapy. Additionally, the most invasive progeny, F1 5Gy HT-29 also displayed a global increased of N-glycosylation partner, with E-cadherin reminiscent hyper-glycosylated, as well. Indeed, alterations in N-Glycosylation partner could be an important pos-translational modification involved in the acquisition of the EMT-*like* phenotype development after therapy. In summary, these results showed that radiation survivor cells can generate cellular progeny with EMT-*like* features that are highly aggressive and that may be responsible for cancer progression related to radioresistance after radiotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localizações primárias estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 2 –	Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes no mundo, em ambos.....	18
Figura 3 –	Modelos da sequência adenoma - carcinoma no câncer colorretal.....	23
Figura 4 –	Perfil da compartimentalização celular na cripta intestinal normal.....	25
Figura 5-	Via WNT canônica.....	27
Figura 6-	Organização e composição molecular das junções intercelulares e junção célula-matriz.....	29
Figura 7-	Esquema ilustrando as alterações ocorridas na EMT e MET e sua contextualização na progressão tumoral.....	33
Figura 8-	Tipos de migração celular e suas características inerentes.....	35
Figura 9-	O papel dos glicanos durante a progressão tumoral e os principais tipos de <i>N</i> -glicanos.....	38
Figura 10-	Análise da radiosensibilidade das células de câncer colorretal Caco-2, HT-29 e HCT-116 e a sobrevivência de suas progênies.....	55
Figura 11-	Análise da expressão de survivina em lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2, HT-29 e HCT-116.....	56
Figura 12-	Análise Morfológica Da progênie derivada de células parentais irradiadas Caco-2 e HT-29.....	57
Figura 13-	Efeitos da radiação sobre a localização subcelular e expressão da proteína de adesão E-caderina nas progênies derivadas de células sobreviventes.....	60
Figura 14-	Efeitos da radiação sobre a localização subcelular e expressão de β -catenina nas progênies derivadas de células sobreviventes.....	63
Figura 15-	Expressão e localização subcelular de vimentina na progênie derivada de células HT-29 irradiadas.....	65
Figura 16-	Análise do citoesqueleto de actina nas progênies derivadas de células irradiadas Caco-2 e HT-29.....	67
Figura 17-	Análise do potencial migratório e invasivo de progênies derivadas de células irradiadas.....	68

Figura 18-	Análise do potencial invasivo e de atividade metaloproteinase de progênies derivadas de células irradiadas.....	70
Figura 19-	Perfil de fosforilação de GSK-3 β e atividade de <i>TCF-LEF</i> na progênie derivada de células HT-29 irradiadas.....	72
Figura 20-	Perfil de expressão gênica relacionado à aquisição de um fenótipo mesenquimal na progênie derivada de células HT-29 irradiadas.....	73
Figura 21-	Análise do perfil global de N-glicanos complexos em lisados celulares de F1 controle e F1 5gy de HT- 29.....	74
Figura 22-	Eletroforese 2D e análise por <i>blotting</i> para L-PHA e <i>western blot</i> para E-caderina.....	76
Figura 23-	Imunoprecipitação de E-caderina e análise por <i>blotting</i> para L-PHA e <i>western blot</i> para E-caderina.....	77
Figura 24-	Imunofluorescência para E-caderina e fluorescência para L-PHA.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de primers utilizados.....	51
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA - Alfa actina de músculo esquelético
AMP- Adenosina monofosfato
ANOVA - Análise de variância
APC - do inglês, *adenomatous polyposis coli*
Asn – asparagina
ATP - adenosina trifosfato
BAD - Promotor de morte associado à Bcl-2
BMP – do inglês *bone morphogenetic protein*
BMP- do inglês *Bone Morphogenetic Protein*
BRAF- do inglês *V-Raf Murine Sarcoma Viral*
BSA - Albumina bovina
CBD - Domínio de ligação à catenina
CCR – câncer colorretal
CDK - Quinase dependente de ciclina
CIMP- do inglês *Cp Island Methylator Phenotype*
CIN- do Inglês *Chromosomal Instability*
CJA – complexo juncional apical
CK- citoqueratina
CK1 - Caseína quinase 1
CKI- do inglês *Casein Kinase I*
CKI- α - Caseína quinase I - α
COX - Cicloxigenase
CTNNB1- do inglês *Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1*
DPAGT1 – do inglês, *Dolichyl-phosphate (UDP-N-acetylglucosamine)*
Dsh (Dvl) - *Dishevelled*
E2F4- do inglês *E2F Transcription Factor 4, p107/p130-Binding*
EC - Domínio extracelular da E-caderina
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF - do inglês, *epidermal growth factor*
EGFR - do inglês, *epidermal growth factor receptor*
EGTA - Ácido tetracético etileno-glicol
EMT- do Inglês *Epithelial Mesenchymal Transition*
EP – Receptor de prostaglandina
Eph- do inglês ephrin
EPLIN - Proteína epitelial perdida em neoplasias
ER- α - Receptor de estrogênio α
ERK - Quinase regulada por sinal extracelular
ESAM - Molécula de adesão seletiva à célula endotelial
FAK - Quinase de adesão focal
FAP – do inglês, *familial adenomatous polyposis*
Fuc – fucose
Fz- do inglês *Frizzled*
Gal – galactose
GalNAc – N-acetilgalactosamina
GDP - guanosina difosfato
Glc – glicose
GlcA – ácido glicurônico
GlcNAc – N-acetilglicosamina
GnT-III – N-acetilglicosaminiltransferase III

GnT-V – *N*-acetilglicosaminiltransferase V
GPI – do inglês, *glycophosphatidyl inositol*
GSK - Glicogênio sintase quinase
GSK3β- do inglês *Glycogen Synthase Kinase3*
HNPCC – do inglês, *hereditary non-polyposis colorectal cancer* TGF-β - Fator de crescimento transformante beta
IARC- do inglês *International Agency for Research on Cancer*
KRAS- do inglês *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
MAP- do inglês *MHY associated polyposis*
MET- do inglês *Mesenchymal-Epithelial Transition*
MIN ou MSI- do inglês *Microsatellite Instability*
MLH1- do inglês *MutL* protein homolog 1
MMR- do inglês *Mismatch Repair*
MMR- do inglês mismatch repair
MSH2- do inglês *MutS* protein homolog 2
MSH6- do inglês *MutS* protein homolog 6
MSI-High- do inglês *microsatellite instability-High*
MSI-Low- do inglês *microsatellite instability-Low*
MUTYH ou MYH - do inglês *mut Y homolog*
NRAS- do inglês Neuroblastoma RAS Viral (V-Ras) Oncogene Homolog
PIK3CA- do inglês *Phosphatidylinositol-4,5-Biphosphate3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha*
PMS2- do inglês *Postmeiotic segregation increased 2*
SMAD4- do inglês *SMAD family Member 4*
SPS- do inglês *Serrated Polyposis Syndrome*
TCF/LEF- do inglês *T-cell Factor - lymphoid enhancer factor*
TCF7L2- do inglês *Transcription Factor-7 like 2*
TGFβR - Receptor de fator de crescimento transformante beta
TGF-β -Fator de crescimento transformante β
TGF-β-RII – do inglês, *transforming growth factor beta receptor II*
Thr - treonina
TJs- do inglês *Tight Junctions*
TNF - Fator de necrose tumoral
TNM – Tumores nódulos e metástases
TP53- do inglês *Tumor Protein 53*
VEGF - do inglês, *vascular endothelial growth factor*
WNT - do inglês, *wingless*
ZEB - Proteína de ligação à região E-box com domínio dedo de zinco
ZO - *Zonula ocludens*
αPKC - Proteína quinase C atípica

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	16
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
1.1	Câncer colorretal: estimativas de incidência, mortalidade e sobrevida.....	16
1.2	Fatores de risco e tipos de manifestação do câncer colorretal.....	18
1.3	Bases moleculares do câncer colorretal.....	20
1.4	Epitélio intestinal e homeostase.....	24
1.5	Adesão celular.....	27
1.6	Mecanismos envolvidos na progressão tumoral e metástase.....	31
1.6.1	<u>Transição epitélio mesenquimal.....</u>	31
1.6.2	<u>Tipos de migração celular.....</u>	34
1.6.3	<u>Glicanos e câncer.....</u>	36
1.7	Tratamentos do câncer colorretal e resistência terapêutica.....	39
1.7.1	<u>Tratamentos.....</u>	39
1.7.2	<u>Mecanismos de resistência terapêutica.....</u>	41
1.8	Justificativa do estudo.....	43
2	OBJETIVOS.....	44
2.1	Objetivo Geral.....	44
2.2	Objetivos Específicos.....	44
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
4	RESULTADOS.....	54
4.1	Progênes de células de câncer colorretal derivadas de parentais irradiadas apresentam níveis diferenciais de radiosensibilidade que estão diretamente correlacionadas com a ativação de caspases.....	54
4.2	Progênes derivadas de células de câncer colorretal sobreviventes à radiação apresentam aumento da expressão de survivina.....	55
4.3	Progênes derivadas das células mais radorresistentes exibem morfologia celular anormal.....	56
4.4	A radiação altera a localização subcelular e expressão do marcador epitelial E- caderina nas progênes derivadas de células sobreviventes à radiação.....	58
4.5	As progênes de células irradiadas apresentam alterações tanto na expressão quanto na localização subcelular de β-catenina.....	61

4.6	O tratamento com a radiação induz um aumento da expressão e intensa reorganização do filamento intermediário vimentina na progênie derivada de células HT-29 irradiadas.....	64
4.7	A progênie de células irradiadas apresentam intensa reorganização do citoesqueleto.....	66
4.8	Progênies derivadas de células HT-29 irradiadas, mas não de Caco-2 apresentam um aumento do potencial migratório.....	67
4.9	A progênie com fenótipo mais migratório, F1 5Gy HT-29, apresenta um aumento do seu potencial invasivo e da atividade metaloprotease.....	69
4.10	Progênie derivada de células HT-29 irradiadas apresenta tanto um aumento na fosforilação de GSK-3β quanto um aumento da atividade transcricional de <i>TCF-LEF</i>.....	71
4.11	Progênie derivada de células HT-29 irradiadas apresenta um aumento na expressão de marcadores mesenquimais e redução da expressão de E-caderina.....	72
4.12	Análise global do perfil de glicosilação de produtos de GNT-V (N-glicanos ramificados do tipo β1,6) na progênie mais invasiva F1 5Gy HT-29.....	74
4.13	Análise do perfil de distribuição de proteínas em gel bidimensional e seu perfil de N-glicosilação na progênie F1 Controle e F1 5Gy de HT-29.....	75
4.14	Células da F1 5Gy HT-29 apresentam moléculas de E-caderina hiperglicosiladas.....	77
4.15	As células da F1 5Gy HT-29 que apresentam intensa marcação para as lectinas L-PHA mostram redução da marcação para E-caderina.....	78
5	DISCUSSÃO.....	79
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7	CONCLUSÃO.....	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer colorretal: estimativas de incidência, mortalidade e sobrevida

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda causa em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2008). Mundialmente, estima-se que ocorrerão 20,3 milhões de novos casos de câncer em 2030 comparados com 12,7 milhões de casos estimados em 2008 e uma predição de 13,2 milhões de mortes associadas ao câncer, o dobro quando comparada com a predição para 2008 que foi de 7,6 milhões (FERLAY et al., 2010).

Dados epidemiológicos mostram que países em desenvolvimento como o Brasil vêm sofrendo uma transição epidemiológica, que consiste na redução da incidência de doenças infecto parasitárias e aumento da incidência de doenças crônico degenerativas, reflexo do aumento da expectativa de vida e do impacto positivo das políticas de saúde pública (MCKEOWN, 2009; BRAY et al., 2012). Na última década a incidência de câncer no mundo aumentou em 20%, sendo o aumento da expectativa de vida, o tabagismo, o sedentarismo e a adoção de dietas ricas em gorduras e produtos industrializados alguns fatores que pelo menos em parte, explicam este aumento. Nos países economicamente emergentes o aumento da incidência poderia também ser explicado em parte pela adoção deste estilo de vida (JEMAL et al., 2011). Alguns tipos de câncer apresentam forte correlação positiva entre sua incidência e o índice de Desenvolvimento Humano (IDH), como no caso do câncer colorretal (CCR), onde 40% da incidência mundial se dá em países com elevado IDH (BRAY et al., 2012). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 apontam que ocorrerão 576.580 casos novos casos de câncer (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Neste contexto, o CCR está entre os tipos de tumores mais comuns que afetam a população brasileira, configurando-se como o terceiro tipo de câncer mais comum entre os homens e o segundo entre as mulheres, seguindo desta forma as tendências mundiais A Fig. 1 ilustra as taxas brutas de incidência e localização primária dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil, exceto pele não melanoma (FERLAY et al., 2010; JEMAL et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

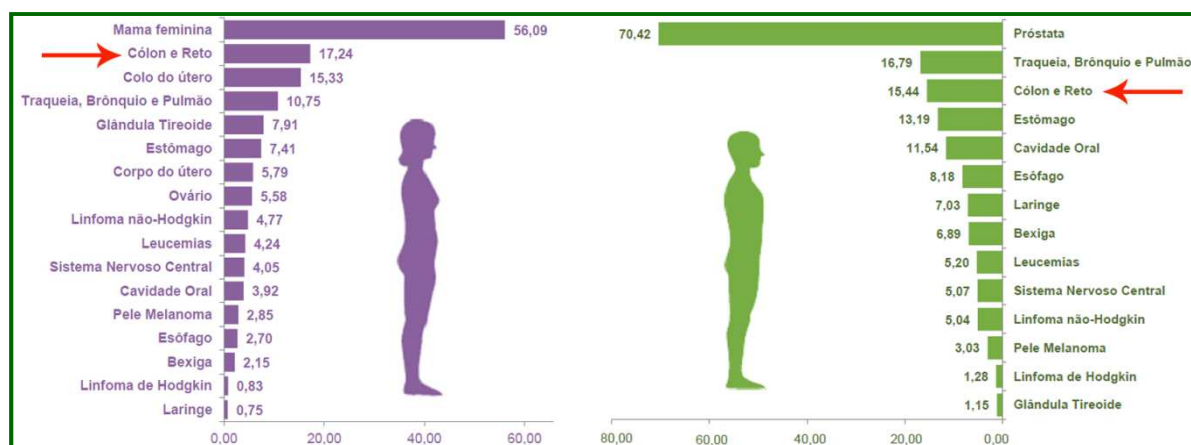


Figura 1: Taxas brutas de incidência de câncer, segundo localizações primárias estimadas para 2014 no Brasil por sexo, exceto pele não melanoma. O câncer de Cólon e Reto configura-se como o segundo tipo de câncer mais incidente nas mulheres e o terceiro nos homens. Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013.

Os dados de incidência mundial são baseados no *GLOBOCAN 2012*, estudo padrão ouro de estimativas mundiais de incidência de câncer e mortalidade fornecidos pelo *International Agency for Research on Cancer (IARC)* e está representado na Fig. 2. O índice de mortalidade para o CCR configura-se em 8,5% dentre todas as taxas de morte relacionadas ao câncer no mundo (sendo mundialmente a quarta maior taxa de mortalidade por câncer) sendo o câncer de pulmão, o que apresenta o maior índice de mortalidade mundial (18,2%) (FERLAY et al., 2010). A sobrevida do paciente com CCR é em torno de 65% em países desenvolvidos e menos de 50% em países em desenvolvimento, sendo o estágio da doença no diagnóstico o fator prognóstico mais importante. Ou seja, a sobrevida em 5 anos para pacientes diagnosticados com doença localizada chega a 90%; para pacientes com estadiamento intermediário a sobrevida estimada é de 69% e para pacientes detectados em estágio avançado da doença a sobrevida é de apenas 11% (SIEGEL et al., 2012).

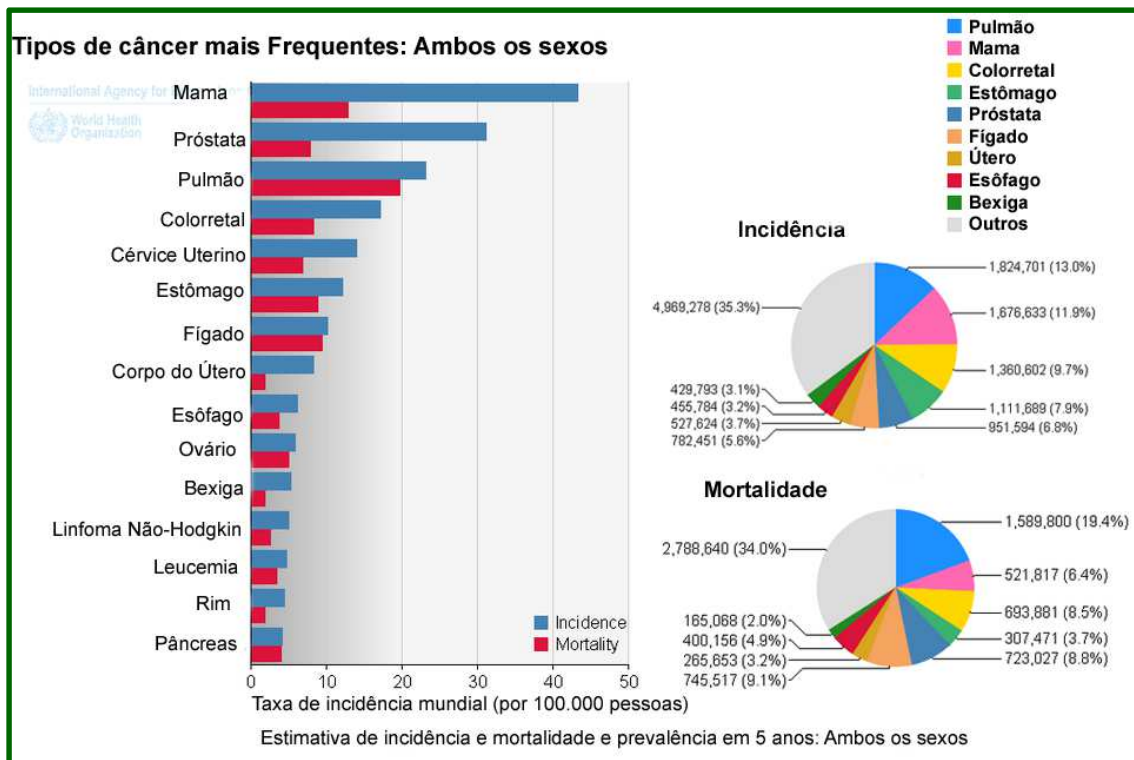


Figura 2: Incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais frequentes no mundo, em ambos os sexos.
 Adaptada de Ferlay *et al.*, 2012.

1.2 Fatores de risco e tipos de manifestação do câncer colorretal

O CCR está associado a fatores de risco como: histórico familiar, fatores ambientais, uma dieta rica em gorduras e, doenças inflamatórias do intestino como retocolite ulcerativa e doença de Crohn. Predisposições genéticas ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino como a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *Familial Adenomatous Polyposis*) e a Síndrome de Lynch ou câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC, do inglês *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*), também são fatores de risco. Outros fatores de risco incluem hábitos como o sedentarismo, a obesidade, o etilismo, tabagismo, e a idade, já que a incidência e a mortalidade aumentam de acordo com a senilidade. Estes fatores são relacionados a três formas distintas de manifestação da doença: esporádica, hereditária e familiar. O CCR esporádico representa aproximadamente 75% dos casos desse tipo de câncer e é resultante da ação cumulativa de fatores ambientais, acometendo indivíduos acima de 50 anos (FEARON, 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

As formas herdadas representam apenas 5% dos casos e são resultantes de mutações na linhagem germinativa, com manifestação fenotípica dependente do gene específico que é

mutado, sendo as síndromes herdadas subdivididas em poliposas e não poliposas. Dentre as poliposas podemos destacar: a FAP clássica (detecção de 100 adenomas ou mais) e a FAP atenuada (10 a 100 adenomas) sendo responsáveis por 1% dos casos de CCR. Tais síndromes são associadas a uma mutação germinativa do gene *APC* (*Adenomatous Poliposis Coli*), o que induz a formação de pólipos adenomatosos (Jasperson et al., 2010). Estudos recentes vêm mostrando outra síndrome semelhante à FAP atenuada, conhecida como MAP (polipose associada *MYH/ MUTYH*), porém a diferença é a base molecular (mutação em *MUTYH* ou *MYH*, não em *APC* como na FAP). Tal gene codifica uma enzima de mesmo nome que participa do reparo por excisão de bases, e é comum a presença de pólipos hiperplásicos nessa síndrome (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009). A Síndrome Polipose Serrátil (SPS, do inglês *Serrated Polyposis Syndrome*) é caracterizada pela presença de múltiplos pólipos hiperplásicos e a base molecular se dá via CIMP (do inglês *Cp Island Methylator Phenotype*) e mutação em *BRAF* (do inglês *v-rafmurine sarcoma viral oncogene homolog B*). Tais pólipos não eram considerados neoplásicos, mas estudos recentes mostram associação entre SPS e desenvolvimento de CCR (ROSTY et al., 2011).

Em relação às síndromes não poliposas, podemos destacar HNPCC, também conhecido como síndrome de Lynch, que apresenta uma incidência de 3% a 4% de todos os CCR, cuja base molecular consiste na mutação da linhagem germinativa em genes de reparo de pareamento incorreto do DNA (MMR, do inglês *Mismatch Repair*), como o *MSH2* e *MLH1* (90%), *MSH6* (10%) e *PMS2* (raro). Embora indivíduos acometidos por HNPCC desenvolvam poucos pólipos, estes são altamente susceptíveis à progressão maligna porque se iniciam com mutações em genes *MMR* que, quando concomitantes com mutações em *APC*, ocasionam rápida transformação através de um fenômeno conhecido como “tumorigênese acelerada”, tornando o HNPCC uma síndrome relacionada a um alto índice (risco maior que 85%) de desenvolvimento de câncer em indivíduos acometidos (FODDE; BRABLETZ, 2007).

Estudos mostram que aproximadamente 30% de todos os casos de CCR possuem algum componente hereditário, devido à ocorrência de casos em membros familiares com graus de parentesco de primeiro e segundo grau, mas apenas 5% dos casos enquadram-se dentro das síndromes herdadas bem caracterizadas mencionadas anteriormente, uma vez que são associadas à herança de mutações de alta penetrância e manifestações clínicas bem conhecidas (FEARON, 2011). A etiologia dos 25% restantes não é completamente entendida e teoricamente, são causadas por alterações genéticas como polimorfismos em genes que

regulam o metabolismo ou genes que são regulados por fatores ambientais (JASPERSON et al., 2010; FEARON, 2011).

1.3 Bases moleculares do câncer colorretal

Em relação aos eventos moleculares, independentemente do modelo de tumorigênese, a maioria dos tumores humanos compartilha dois mecanismos críticos em seu desenvolvimento: A ativação oncogênica, promovendo proliferação e sobrevivência; e a inativação ou desbalanço da expressão de genes supressores tumorais, que controlam negativamente o desenvolvimento e o crescimento dos tumores. Os proto-oncogenes se transformam em oncogenes através de múltiplos mecanismos, como translocações cromossômicas, alteração do número de cópias de genes ou cromossomos, deleções, inserções e mutações pontuais (VOGELSTEIN; KINZLER, 2004). Esta ativação oncogênica se dá de maneira dominante, onde a mutação de um alelo do proto-oncogene é suficiente para o ganho de função. Já os genes supressores tumorais, podem ser inativados ou apresentarem sua expressão reduzida através de mutações em sequências que codificam resíduos essenciais para a sua atividade, mutações que codificam uma proteína truncada ou por deleções ou inserções. Postulava-se inicialmente, que a perda de função dos genes supressores tumorais ocorria de modo recessivo, no qual seriam necessários eventos mutacionais nos dois alelos, teoria designada como “*two-hit hypothesis*” (KNUDSON, 1985). Porém, recentemente evidências mostram que a inativação de alguns genes supressores tumorais não é totalmente recessiva e em determinadas situações, a presença de apenas um alelo mutante pode conferir vantagem seletiva ao longo do processo tumorigênico quando comparado a situações em que ambos os alelos encontram-se mutados (BERGER et al., 2011). Além destes mecanismos clássicos, podem ocorrer também alterações no nível de expressão desses genes, através do silenciamento por micro-RNAs e metilação, não necessariamente via eventos mutacionais (TAY et al., 2011).

O CCR é uma doença heterogênia em relação ao seu mecanismo de desenvolvimento. Existe uma controvérsia entre os pesquisadores que atribuem à instabilidade genômica o evento molecular base para a aquisição de mutações subsequentes, fenômeno conhecido como fenótipo mutador, e aqueles que a consideram uma consequência após o acúmulo de mutações *per se*. Embora não esteja claro se a instabilidade genômica é causa ou consequência, o fato é que ela está presente em diversos tumores e até o momento, são descritas pelo menos três

principais mecanismos relacionados ao CCR: a) a instabilidade cromossômica (CIN, do Inglês *Chromosomal Instability*), b) a instabilidade de microssatélite (MIN ou MSI, do inglês *Microsatellite Instability*) e, c) o fenótipo metilador de ilhotas CpG (CIMP) (BOLAND; GOEL, 2010; PINO; CHUNG, 2010).

A CIN está presente em 70 a 80% dos casos de CCR e caracteriza-se por alterações numéricas (aneuploidia) e anormalidades estruturais, como perdas e ganhos de regiões cromossômicas (principalmente nos braços 5q, 8p, 17p, and 18q). Concomitante à presença deste tipo de instabilidade genômica, observa-se um acúmulo de mutações em genes supressores tumorais como *APC*, *TP53* e *SMAD4* e oncogenes como *KRAS*, *CTNGB1* e *PIK3CA*, presentes nessas mesmas regiões cromossômicas citadas anteriormente (PINO; CHUNG, 2010). Porém, o quanto a CIN cria um ambiente apropriado para o acúmulo dessas mutações, ou vice-versa, permanece uma questão a ser esclarecida, uma vez que a própria mutação em *APC* (presente em 70% de lesões iniciais do tipo adenomas) interfere na segregação cromossômica, favorecendo a CIN. Desta forma, a aquisição de uma mutação ocorreria antes do estabelecimento da CIN (MORÁN et al., 2010).

A MIN tem sido caracterizada pela expansão ou contração de sequências repetitivas presentes em regiões do genoma conhecidas como microssatélites. Tais regiões estão sujeitas a uma grande taxa de erros durante o processo de replicação do DNA, os quais são reparados por enzimas codificadas pelos genes *MMR*. Dessa forma, a inativação desses genes, seja por mutações ou silenciamento epigenético leva ao desenvolvimento da MIN, ocasionando o acúmulo de mutações nos microssatélites (tanto em regiões regulatórias como em regiões codificadoras) e gerando fenótipos hipermutáveis, apresentando alta (*MSI-High*) ou baixa instabilidade (*MSI-Low*) (POULOGIANNIS et al., 2010). Porém, de forma interessante, estudos mostram que indivíduos com CCR com MSI-H apresentam melhor prognóstico do que aqueles sem MSI (JASPERSON et al., 2010). A MIN ou MSI é detectada em aproximadamente 15% de todos os CCR, onde 3% são associados à síndrome de Lynch (via mutação germinativa nos genes *MMR*) e os outros 12% aos CCR esporádicos (via silenciamento epigenético de *MLH1*) (BOLAND;GOEL, 2010). Este tipo de instabilidade implica na perda de mecanismos críticos para a manutenção da fidelidade genômica durante a divisão celular, induzindo assim resistência a apoptose após danos no DNA e afetando genes reguladores do crescimento, sendo frequentemente encontradas mutações em *TGF- β 1*, *PIK3CA*, *IGF2R* e *E2F4* (VILAR; GRUBER, 2010).

A CIMP é caracterizada pela hipermetilação de ilhotas CpG (regiões ricas em bases nitrogenadas citosina e guanina) e é responsável pela MSI em tumores colorretais esporádicos, através da metilação da região promotora do gene *MLH1*. Essas ilhotas estão presentes em aproximadamente 60-70% das regiões promotoras de genes e quando estão hipermetiladas induzem repressão gênica, sendo detectada em 15% de todos os CCR, onde 3% associam-se à síndrome de Lynch e os outros 12% aos esporádicos (BOLAND; GOEL, 2010). Dessa forma, as alterações genômicas causadas pelos processos descritos acima podem levar a ativação de oncogenes e/ou a inativação de genes supressores tumorais, resultando na desregulação de diversos eventos celulares, como aqueles relacionados ao ciclo celular, apoptose e senescência, permitindo uma expansão clonal de células mutantes, propagação da instabilidade genômica e induzindo a formação de lesões neoplásicas benignas ou malignas. Dentre os genes mais alterados no CCR podemos mencionar: os genes supressores tumorais: *APC*, *TP53*, *SMAD2*, *TGFBR2*; os oncogenes *KRAS*, *PIK3CA*, *TCF7L2*, *NRAS*, *BRAF* e *CTNNB1*; e os genes relacionados ao reparo do DNA: *MLH1*, *MSH2*, *MSH* e *PMS2* (JASS, 2007; NETWORK, 2012).

Alterações em *APC* são consideradas como evento inicial para formação de pólipos, por favorecer a hiperproliferação celular. Tais pólipos podem progredir para um tumor maligno, sendo a base do modelo "*multistep*" da carcinogênese proposto por Fearon & Vogelstein em 1990. Este modelo baseia-se na instabilidade genômica e consiste na sequência adenoma-carcinoma, enfatizando a presença dos pólipos adenomatosos como lesão precursora, iniciados pela ativação aberrante da via APC/ β -catenina, seguida por mutações em *RAS/RAF* e perda de p53 em estágios tardios. Tais alterações genéticas se refletem em alterações histopatológicas sequenciais: transformação do epitélio normal em um epitélio adenomatoso intermediário e posteriormente tardio, este para um adenocarcinoma e finalmente o desenvolvimento de um carcinoma. Embora este seja um modelo elegante da progressão do CCR de origem poliposa, e de suma importância para o entendimento de mecanismos e vias de sinalização envolvidos em outros tipos de câncer, 30% dos CCR não seguem este modelo (BOLAND;GOEL, 2010). Porém, é importante mencionar que a maioria dos casos de CCR é derivada de lesões benignas, evidenciado pelo fato de que a detecção precoce e retirada dos pólipos previnem o desenvolvimento do tumor (Ewing et al., 2014). Sendo assim, a sequência adenoma-carcinoma tem sido revisada e a Fig. 4 ilustra os três mecanismos distintos envolvidos no desenvolvimento e progressão do CCR: a via tradicional (CIN), a via alternativa (MIN) e a via dos pólipos serrateis (CIMP).

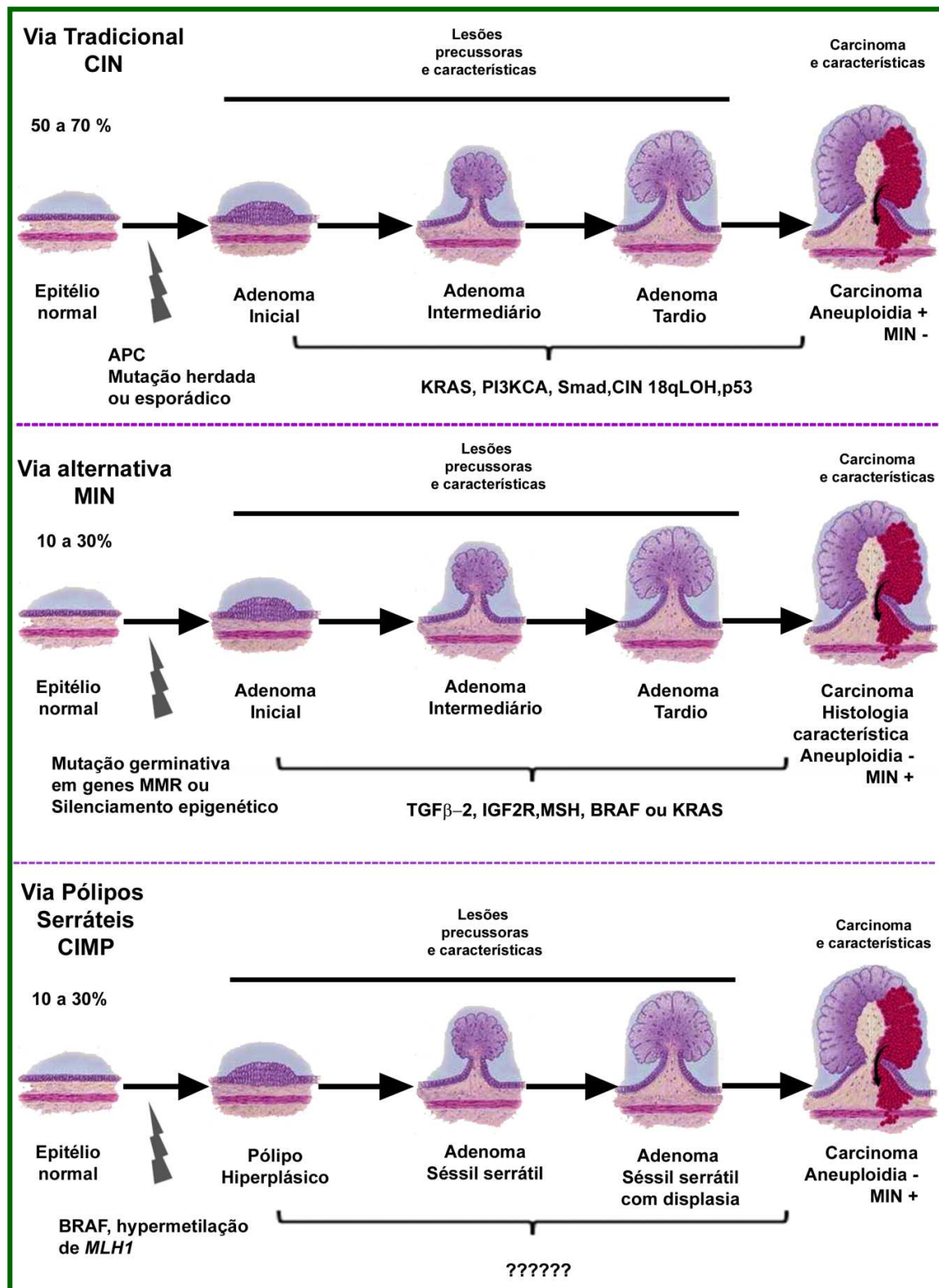


Figura 3: Modelos da sequência adenoma-carcinoma em CCR. Mecanismos atuais envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer colorretal, bem como as características gerais das lesões precursoras e dos carcinomas: Via da instabilidade cromossômica (CIN); a via da instabilidade de microsatélite (MIN) e a via dos pólipos serrateis (CIMP). Adaptado de (GURUSWAMY; RAO, 2008; AHNEN, 2011; PANCIONE et al., 2012)

1.4 Epitélio intestinal e homeostase

O intestino é anatomicamente dividido em intestino delgado (que é subdividido em duodeno, jejuno e íleo) e o intestino grosso (formado pelo ceco, cólon, sigmoide, reto e ânus). O lúmen intestinal é revestido por um epitélio cilíndrico, formado por populações heterogêneas de células colunares (ou cilíndricas). A organização modular de todo o epitélio intestinal é caracterizada pela presença de invaginações epiteliais para dentro do tecido conectivo, formando unidades funcionais denominadas de criptas. Embora todas as células absorptivas apresentem microvilosidades, somente o intestino delgado apresenta-se organizado em criptas e vilosidades (projeções para o interior da cavidade luminal). No cólon, observa-se uma organização em criptas e uma superfície lisa e contínua, com a presença de microvilosidades apenas na porção apical das células que compõem o epitélio (VAN DER FLIER et al., 2009). Existe uma compartimentalização distinta ao longo da cripta (no caso cólon) ou ao longo do eixo cripta-vilus (no caso do intestino delgado), sendo o terço inferior composto por células de paneth (presentes somente no intestino delgado) e as células tronco multipotentes, as quais realizam divisão assimétrica e geram células progenitoras amplificadoras transitórias que se localizam no terço médio da cripta. Estas células progenitoras então dão origem a células comprometidas com a diferenciação nos diversos tipos celulares epiteliais: absorptiva (enterócitos) e secretória (*globet* e enteroendócrina), que diferenciam-se a medida que migram para o terço superior da cripta (PINTO;CLEVERS, 2005; FODDE; BRABLETZ, 2007). Devido ao contínuo estresse físico que ocorre no lúmen intestinal, a mucosa encontra-se em constante renovação, sendo a cripta um compartimento dinâmico com um perfil diferenciado de expressão gênica. Assim, na região mais basal da cripta encontram-se células em atividade mitótica, portanto indiferenciadas, e um processo de migração e diferenciação ao longo da cripta, seguidos de parada do ciclo celular e apoptose com intuito de renovação total do epitélio, como ilustradas na Fig. 4. O epitélio intestinal humano é totalmente renovado a cada cinco dias, sendo o órgão mais auto-renovável dos mamíferos adultos (VAN DER FLIER et al., 2009).

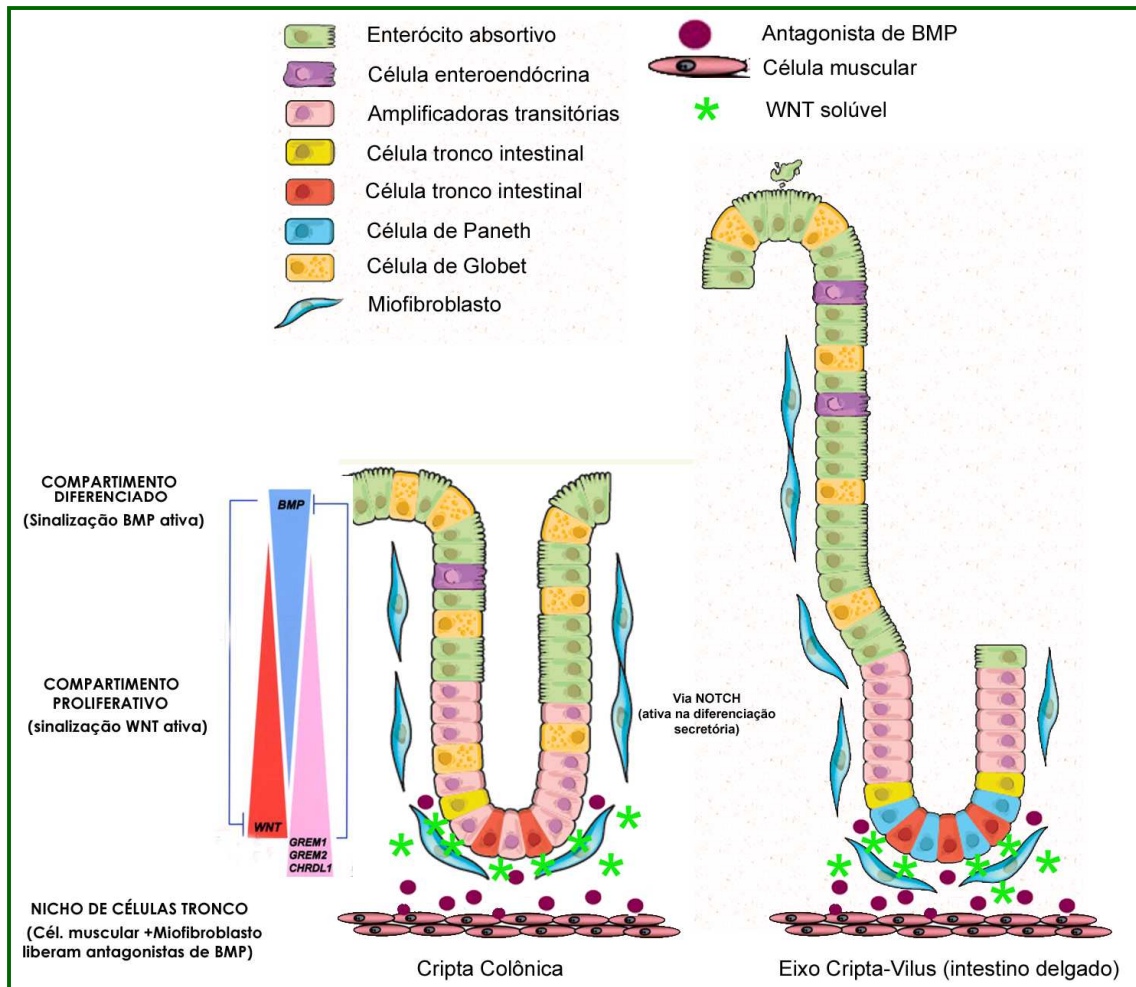


Figura 4: Perfil da compartimentalização celular na cripta intestinal normal. Células normais presentes na parte superior da cripta apresentam ativação de vias relacionadas com a parada do ciclo celular e inibição da proliferação, enquanto o nicho de célula tronco apresentam vias de diferenciação inativadas. Adaptado de (KOSINSKI et al., 2007; MEDEMA ;VERMEULEN, 2011)

A Fig. 4 ilustra também a compartimentalização da cripta, bem como as principais vias de sinalização que mantêm a homeostase do sistema. A sinalização *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) atua na diferenciação intestinal (GIEPMANS; VAN IJZENDOORN, 2009). A via NOTCH direciona as células para a linhagem secretória do intestino (VAN;CLEVERS, 2005). Já a via canônica *wingless* (WNT) é a principal reguladora da expressão gênica ao longo da cripta e atua na manutenção da célula tronco intestinal e proliferação de células progenitoras (MEDEMA;VERMEULEN, 2011). As células tronco epiteliais intestinais localizam-se num ambiente designado nicho de célula tronco, no qual há um contato direto com os miofibroblastos sub-epiteliais que secretam glicoproteínas ligantes do receptor

Frizzled. Esta interação ligante-receptor ativa a via canônica WNT (Fig. 5), na qual a β -catenina, proteína da junção aderente, cumpre um papel central nesta via. Na ausência de ligantes, a via WNT está inibida e a β -catenina citoplasmática é direcionada para a degradação via proteossoma, mediada por um complexo fosfo-destrutivo composto pelas proteínas *Glycogen Synthase Kinase3* (GSK3 β), Axina, APC e *Casein Kinase I* (CKI). Porém, quando proteínas WNT solúveis são secretadas pelas células e se associam aos receptores *Frizzled* (Fz) e *Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6* (LRP5/6), ocorre uma ativação da via WNT, o que leva a dissociação do complexo destrutivo, inibindo assim a degradação de β -catenina citoplasmática. Assim, esta proteína se acumula no citoplasma, podendo se translocar ao núcleo, onde associa-se ao fator transcricional *T-cell Factor - lymphoid enhancer factor* (TCF/LEF), o que induz a transcrição de genes relacionados com a proliferação celular e evasão da apoptose (NIESSEN; GOTTARDI, 2008). O acúmulo nuclear da β -catenina é preferencialmente observado nas células da base das criptas e esse acúmulo diminui gradativamente conforme as células se aproximam do topo da cripta (NIESSEN; GOTTARDI, 2008; ANASTAS; MOON, 2013).

De acordo com o descrito até o momento, existem algumas vias consideradas essenciais ao longo da tumorigênese e progressão do CCR, que são ativadas por mecanismos moleculares diversos, sugerindo uma convergência de sinalização. Um exemplo clássico é justamente a via WNT, uma vez que ela é uma das vias mais importantes na manutenção da homeostase intestinal. Esta via encontra-se alterada em 93 a 97% dos casos de CCR, sendo observadas mutações e expressão alterada em diversos mediadores da via, principalmente nos genes *APC* e *CTNNB1* (NETWORK, 2012). Esta via influencia na regulação da β -catenina citoplasmática, e pode ser ativada tanto via ligantes e seus receptores Fz ou independente de ligante, como no caso de mutações em componentes *downstream* da via como *APC* (mutado em 60 a 80% dos casos de CCR) e o próprio gene da β -catenina. Alterações em *APC* são consideradas como evento inicial para formação de pólipos, por favorecer a proliferação celular.

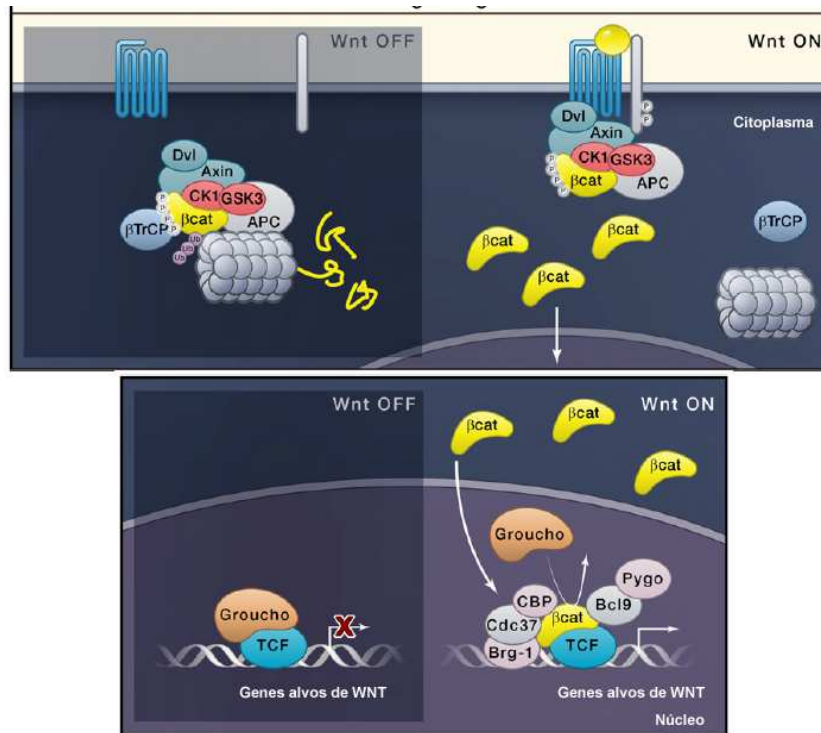


Figura 5: Via WNT canônica. A) Na ausência de estímulo ou mutações em componentes da via, os níveis de β -catenina citoplasmática são mantidos através do complexo formado por APC/CKI/GSK3/axina, o qual fosforila e direciona β -catenina para degradação via proteossoma. B) Com a ativação da via *Wnt*, (dependente ou independente de ligante) o complexo APC/CKI/GSK3/axina, é inibido, impedindo que β -catenina seja degradada. Assim, essa proteína acumula no citoplasma e pode ser translocada para o núcleo, onde se associa a fatores transcripcionais e induz a expressão de genes alvos. Adaptado de (CLEVERS ;NUSSE, 2012).

Além de vias de sinalização que modulam a compartimentalização diferenciada ao longo da cripta, o bom funcionamento do epitélio depende da integridade e manutenção do complexo juncional apical, que forma barreiras paracelulares ao longo do epitélio. Além disso, as proteínas desse complexo podem desempenhar tanto uma função estrutural, atuando na manutenção da arquitetura tecidual quanto em eventos de sinalização relacionados à proliferação e migração (GIEPMANS; VAN IJZENDOORN, 2009).

1.5 Adesão celular

A integridade epitelial é mantida principalmente pelas junções intercelulares, constituídas pelas junções *tight* (JT), junções aderentes (JA), desmossomos e junções comunicantes e pelo complexo de adesão célula-matriz. O complexo juncional apical (CJA)

compreende as JT e JA, formando domínios funcionais lípido-protéicos na membrana plasmática, gerando uma polaridade celular ápico-baso-lateral que é de extrema importância na organogênese e na fisiologia dos tecidos epiteliais e endoteliais (NIESSEN; GOTTARDI, 2008; GIEPMANS; VAN IJZENDOORN, 2009). Basicamente, as junções *tight* são um complexo protéico cujas proteínas transmembrana claudinas, ocludina e JAM se ancoram ao citoesqueleto de actina através de proteínas denominadas ZO's (*Zonula Occludens*). Já as junções aderentes que também são complexos protéicos formados neste caso por proteínas transmembrana caderinas e nectinas que se ancoram ao citoesqueleto de actina através das proteínas cateninas e afadina são as principais responsáveis pela adesão física entre células adjacentes, participando também na manutenção da polaridade celular e controle da proliferação celular (WANG et al., 2011). Em geral, o domínio apical contém canais iônicos, transportadores e receptores de membrana; a porção lateral do domínio baso-lateral contém proteínas envolvidas na adesão às células vizinhas (formando as junções *tight*, aderente e desmossomos) e no processo de comunicação celular (formando as junções tipo *gap*), além de receptores. A porção basal contém proteínas envolvidas na adesão célula-matriz, como as integrinas, e sítios de ligação para constituintes da lâmina basal (MIYOSHI; TAKAI, 2008). A Fig. 7 mostra a organização e composição molecular das junções intercelulares e junção célula-matriz.

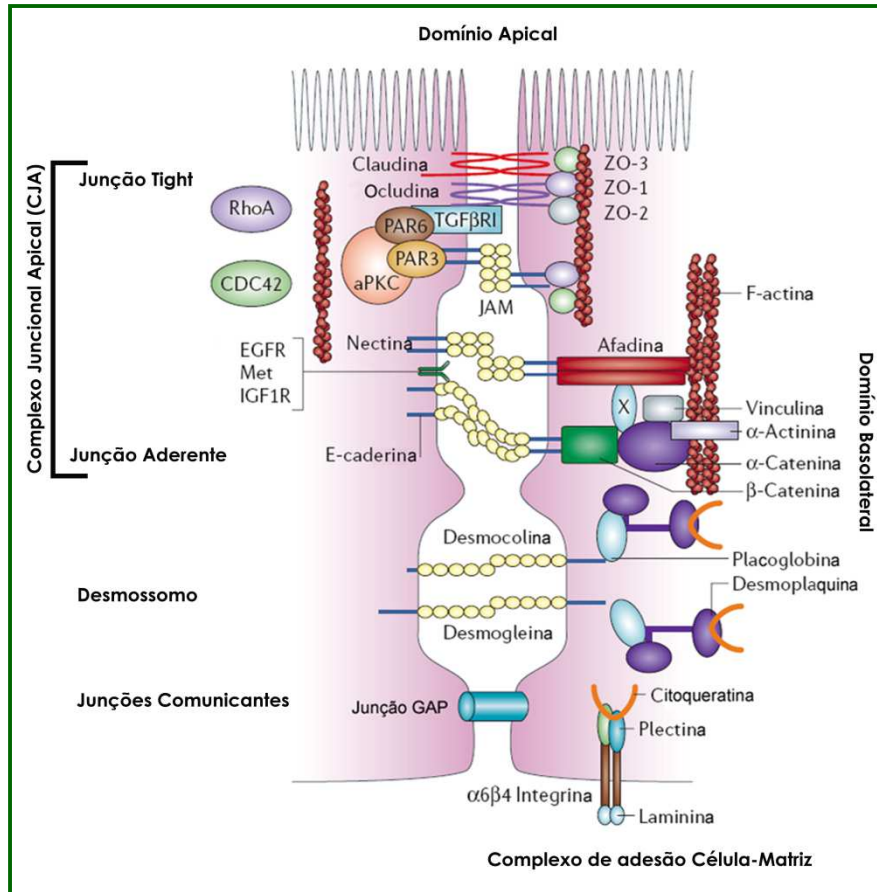


Figura 6: Organização e composição molecular das junções intercelulares e junção célula-matriz. O esquema mostra a localização das junções *tight*, aderentes, gap e desmossomos, assim como seus componentes moleculares. Junções aderentes e *tight* e desmossomos se conectam ao citoesqueleto, estabilizando a adesão célula-célula. A adesão célula-matriz é mediada pelas integrinas. Adaptado de (THIERY; SLEEMAN, 2006).

As caderinas são subdivididas em seis famílias (caderinas clássicas do tipo I e II, caderinas desmossomais, caderinas transmembranares de sete passagens, grandes caderinas e protocaderinas), sendo a do tipo I a principal proteína transmembrana de células epiteliais (STEMMLER, 2008). Possui cinco domínios extracelulares repetitivos (conhecidos como EC, do inglês *Extracellular Cadherin*) responsáveis pela ligação homotípica cálcio dependente com caderinas de células adjacentes; um domínio justamembranar (conhecido como JMD, do inglês *Juxtamembrane Domain*) e um domínio citoplasmático (CBD, do inglês *Catenin Binding Domains*), o qual é responsável pela ligação à β -catenina (POKUTTA; WEIS; 2007HARRIS; TEPASS, 2010). O complexo E-caderina- β -catenina co-localiza com filamentos de actina em junções epiteliais apicais, formando um anel circunferencial de actina em torno da membrana lateral da célula.

Nesse contexto, a desorganização das junções aderentes constitui um dos "*hallmarks*" das células epiteliais sob transformação celular e são observadas em lesões precursoras e lesões tumorais, sendo a E-caderina considerada uma proteína supressora tumoral. Alterações na expressão e localização da E-caderina estão associadas à tumorigênese e progressão tumoral tanto em humanos quanto em modelos celulares e animais. Mutações no gene da E-caderina (*CDH1*) são eventos raros, mas estão correlacionados com o desenvolvimento de alguns carcinomas (principalmente em casos hereditários de carcinoma gástrico difuso, carcinoma de mama lobular e carcinoma hepatocelular) e na grande maioria dos casos as alterações mais comuns são aquelas relacionadas com a redução da expressão ou silenciamento gênico (TSANOU et al., 2008). A expressão anormal de E-caderina tem sido reportada em lesões pré-cancerosas, como no esôfago de Barrett, gastrite ativa tipo B, e neoplasia intraepitelial cervical. Eventos epigenéticos também estão envolvidos na diminuição da expressão da E-caderina durante a progressão tumoral em carcinomas de mama, próstata e colorretal (JEANES et al., 2008; TSANOU et al., 2008). Além disso, alterações pós-traducionais como a glicosilação em sítios do domínio extracelular da E-caderina, promovem uma instabilidade da adesão intercelular em células de câncer colorretal (de FREITAS JUNIOR et al., 2011). Em amostras de CCR tem sido observada uma redução da expressão de E-caderina no tecido tumoral em relação ao tecido adjacente e em estádios mais avançados (SCHUHMACHER et al 1999; NIESSEN, GOTTARDI, 2008; TSANOU et al., 2008). Uma importante consequência funcional das alterações de expressão e localização da E-caderina é o aumento do *pool* citoplasmático de β -catenina (co-ativadora transcricional da via WNT) que pode promover ativação aberrante da via WNT canônica, conforme mencionada anteriormente. Este evento pode contribuir para carcinogênese e metástase, atuando de duas formas: desregulando a inibição por contato e permitindo uma hiperproliferação ou favorecendo o processo de migração e invasão por redução da adesão às células vizinhas (FODDE; BRABLETZ, 2007). No entanto, embora seja um consenso na literatura a participação desta via e seus efetores no início do processo tumorigênico, pouco se sabe em relação à função e localização da β -catenina e sua influência ao longo da progressão tumoral e na resposta a tratamentos. Além disso, alterações da organização epitelial, no que diz respeito à adesão celular, são eventos importantes ao longo da progressão tumoral, sendo a principal característica de eventos relacionados à Transição Epitélio Mesenquimal.

1.6 Mecanismos envolvidos na progressão tumoral e metástase

1.6.1 Transição epitélio mesenquimal

A maioria dos tumores humanos é de origem epitelial e 90% das causas de mortalidade por câncer são atribuídas à metástase, e não ao tumor primário do qual tais lesões malignas são provenientes. Similar a outros tipos de câncer, o carcinoma colorretal apresenta uma certa preferência de órgão para formação de metástase, sendo o fígado envolvido em 70% dos casos de metástases provenientes de CCR. O segundo órgão alvo de metástase do CCR é o pulmão, sendo responsável por 20 a 30% de todas as metástases distantes derivadas deste tipo de câncer (SCHLUTER, K, 2006). A habilidade de metastização está associada a diversos fatores, tais como: capacidade de invasão de tecidos adjacentes; intravasamento; sobrevivência na circulação sanguínea ou linfática; extravasamento vascular e colonização de órgãos secundários (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Diversos estudos mostram que a progressão do câncer epitelial envolve a redução de expressão de marcadores epiteliais e aquisição de uma morfologia mesenquimal, com reorganização do citoesqueleto e aumento das propriedades migratórias e invasivas. Tais alterações são remanescentes da Transição Epitélio Mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial Mesenchymal Transition*), um processo fisiológico que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e no reparo tecidual, e que pode ser reativado em processos patológicos como na fibrose e na progressão de tumores epiteliais (THIERY et al., 2009).

Por definição, a EMT é um processo dinâmico de alteração fenotípica frequentemente reversível, no qual células epiteliais aderentes apresentam redução da expressão de marcadores epiteliais (ex: E-caderina, ZO-1, claudinas, ocludinas e citoqueratinas em alguns casos) e aumento de marcadores mesenquimais (como N-caderina, vimentina e α -actina de músculo liso). A regulação da EMT se dá tanto por mecanismos não transcricionais (pequenos RNAs não codificantes (*small non-coding RNAs*), *splicing* alternativo e controles traducionais e pós traducionais, os quais afetam a estabilidade e localização proteica) quanto por controle transcricional, através da expressão de fatores de transcrição indutores de EMT (EMT-TFs) como Snai1 (Snail), Snai2 (Slug), Twist1, Zeb1 e Sip1 (TAUBE et al., 2010; DE CRAENE; BERX, 2013). Estes fatores de transcrição não estão restritos à regulação de E-caderina e outras proteínas do complexo juncional na EMT, mas também estão envolvidos na regulação da motilidade celular, proliferação, diferenciação e apoptose (BARRALLO-GIMENO;

NIETO, 2005; LAMOUILLE et al., 2014). Estudos mostram a importância da ativação de Twist na aquisição de invasividade e reversão da senescência induzida por ativação oncogênica (WEINBERG, 2008), mostrando a importância desse fator de transcrição em eventos pré-metastáticos precoces ao longo da progressão tumoral e favorecendo o racional de existência de metástase antes mesmo que o tumor seja detectável ao diagnóstico (COGHLIN; MURRAY, 2010). Além disso, de forma interessante, a função desses EMT-TFs na homeostase normal de células epiteliais diferenciadas ainda não é definida, embora estes estejam presentes naturalmente em vários tipos celulares diferenciados não epiteliais normais, como células hematopoiéticas, linfócitos e neurônios (DE CRAENE; BERX, 2013).

É importante mencionar que a EMT atua tanto na conversão mesenquimal de células epiteliais normais quanto tumorais, e no contexto das neoplasias, o desenvolvimento de EMT resulta na aquisição de características biológicas que são associadas com aumento da malignidade (THIERY et al., 2009). Além da EMT, evidências sugerem que o processo de transição mesênquimo-epitelial (MET, do inglês *Mesenchymal-Epithelial Transition*), inverso à EMT, ocorra na formação tecidual ectópica durante a instalação da metástase, permitindo que as células que sofreram EMT e realizaram intravasamento e extravasamento, possam aderir e proliferar nos sítios secundários de metastização (BRABLETZ *et al.*, 2001). A Fig. 7 ilustra as alterações celulares ocorridas durante o processo da EMT e MET e sua contextualização na progressão tumoral e metástase.

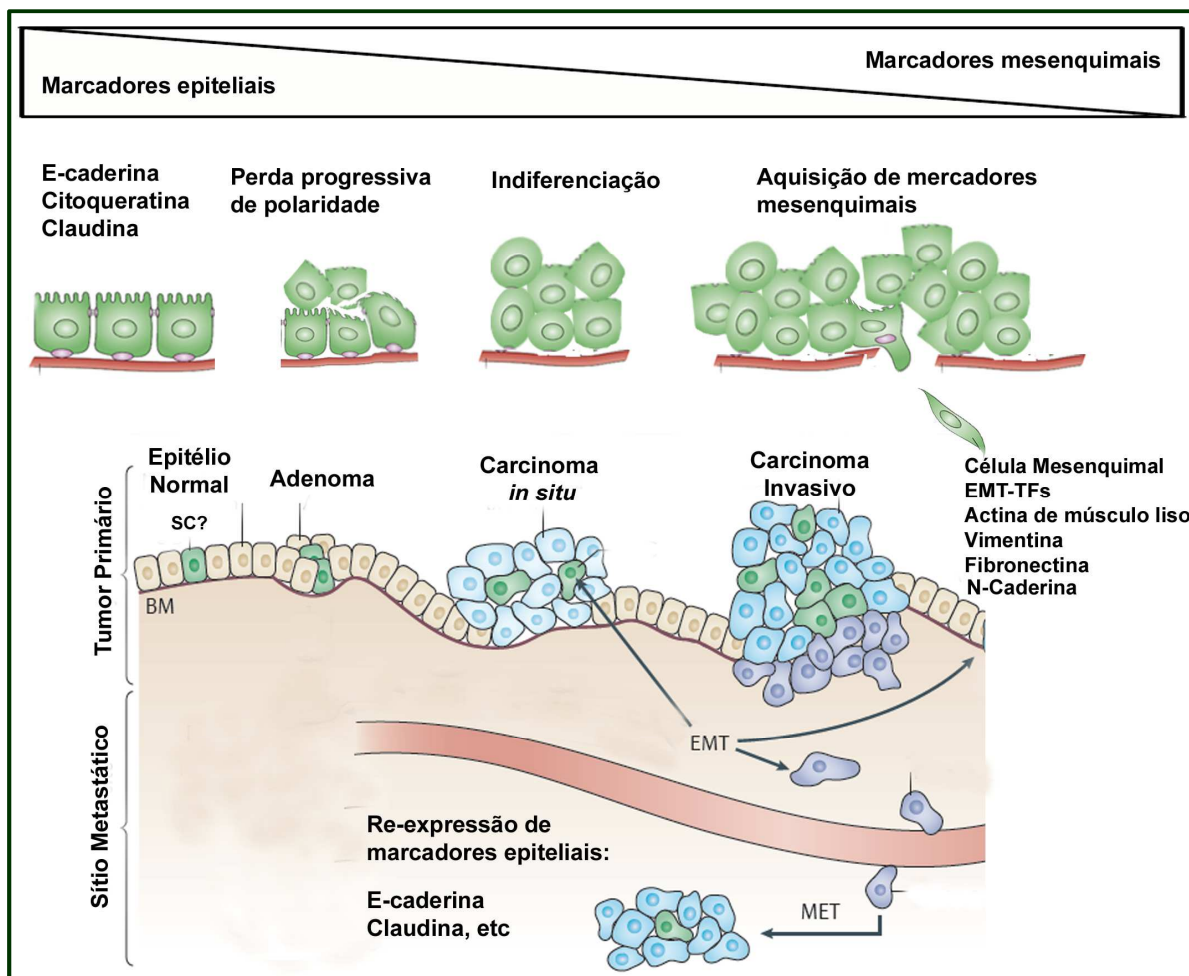


Figura 7: Esquema ilustrando as alterações ocorridas na EMT e MET e sua contextualização na **progressão tumoral**. As células epiteliais perdem progressivamente sua polaridade, os marcadores epiteliais e ocorre um ganho de marcadores mesenquimais, bem como um aumento da expressão de fatores transcricionais relacionados à EMT (EMT-TFs). As células adquirem um fenótipo mesenquimal, se desprendem do epitélio e invadem a camada basal, realizam o intravasamento, extravasamento e posteriormente desenvolvem a MET no sítio metastático. Adaptado de (CONDEELIS; SEGALL, 2003; DE CRAENE; BERX, 2013)

Além de aumentar a capacidade invasiva e migratória, estudos recentes mostram o envolvimento da EMT na manutenção e desenvolvimento de características *Stem cell* (SC), através de evidências de interconversão de uma célula epitelial em uma SC após a ativação do repertório gênico de EMT, contribuindo diretamente tanto para a repopulação e manutenção do tumor quanto para a sua heterogeneidade, o que favoreceria também a aquisição de habilidade metastática e resistência a tratamentos (DE CRAENE; BERX, 2013). Tal evidência também reforça a hipótese de que, células que sofreram EMT são capazes de formar

metástase através do seu potencial invasivo adquirido, possuindo vantagens seletivas de sobrevivência ao microambiente adverso a qual é exposta, até que a metástase seja concluída. Sendo assim, quando a célula chega ao órgão alvo, o potencial de auto-renovação adquirido (*stemness* adquirida via EMT) é importante para permitir a adaptação ao novo microambiente, proliferar e expandir-se até a formação de uma metástase macroscópica (TAUBE et al., 2010).

Apesar destas evidências, nos últimos anos o conceito da EMT tem recebido muitas críticas. Alguns pesquisadores acreditam que a EMT seja um artefato e um equívoco patológico, uma vez que em uma lâmina, ou em técnicas de biologia celular e molecular, o que é visto são "fotos" retiradas de um processo extremamente dinâmico e atribuem a habilidade de formar metástases como intrínseca de células tronco, e que todo o repertório gênico caracterizado na EMT, seria uma característica de células pluripotentes. Um exemplo é a observação da expressão de Snail e Slug em tecidos normais, nos compartimentos enriquecidos de célula tronco, como nos melanócitos, células hematopoiéticas e em células epiteliais do esôfago, o que não significa que estas células encontram-se em uma progressão tumoral. Estudos sugerem que esses fatores de transcrição sejam responsáveis pela manutenção da plasticidade das células tronco. As controvérsias também são fomentadas devido a dificuldade de se obter marcadores específicos de TEM, uma vez que o que ocorre na realidade são gradientes de EMT, e somente experimentos *in vitro* conseguem reportar, até o momento, uma EMT completa (LEDFOORD, 2011; TARIN et al., 2005).

1.6.2 Tipos de migração celular

Devido a ampla heterogeneidade dos tumores sólidos, outros mecanismos além da EMT, podem estar relacionados à progressão tumoral e metástase dos tumores epiteliais. A EMT gera células com capacidade migratória e invasiva do tipo mesenquimal, em *single cell*, onde as células são alongadas (formato fibroblástico) e o processo invasivo requer altos níveis de adesão célula- matriz e proteólise (FRIEDL; WOLF, 2010). Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que as células infiltram-se pela matriz de diversas formas, via células individuais ou por grupos de células, caracterizando a invasão coletiva. Em princípio, quanto menos diferenciado o tumor, mais propenso a realizar migração via *single cells*. Sendo assim, os modos de migração coexistem e inclusive são capazes de realizar uma interconversão entre eles dependendo do estímulo do microambiente. A migração ameboide constitui-se outro tipo de migração *single cell*, onde as células são arredondadas e a invasão é dependente de

contratilidade da actomiosina cortical e independente de metaloproteases e adesão à matriz (FRIEDL; WOLF, 2003). A expressão de moléculas relacionadas ao modo de invasão mesenquimal e amebóides pode ser observada no *front* invasivo em modelos de carcinoma mamário (WANG et al., 2004; VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Histopatologicamente, a invasão em amostras de pacientes é definida como a presença de células isoladas, em grupos compactados ou em grupos de células interconectados que se organizam em filas no tecido normal subjacente ao tumor. Embora a maioria dos tumores de baixo estadiamento retenha a adesão celular e invadam em filas multicelulares, tumores de estadiamento tardios apresentam invasão heterogênea, em forma de grupos celulares e algumas áreas de invasão em *single cell*. Dessa forma, embora a invasão do tipo *single cell* possa aumentar a eficiência metastática, o desprendimento da massa tumoral, invasão e intravasão podem ser realizados em grupos de células, como observado tanto em amostras de sangue quanto em tecidos de pacientes (FRIEDL; WOLF, 2003; FRIEDL; WOLF, 2010; HOU et al., 2011). A maioria dos tumores aparentemente invade em unidades multicelulares coesivas, mas é possível que uma célula "líder", localizada na zona do *front* da invasão coletiva possa sofrer EMT, com intuito de direcionar o movimento da invasão coletiva (FRIEDL; WOLF, 2003; VALASTYAN; WEINBERG, 2011; ALEXANDER; FRIEDL, 2012). A Fig. 8 ilustra os tipos de migração celular envolvidas na adesão e metástase e suas características inerentes.

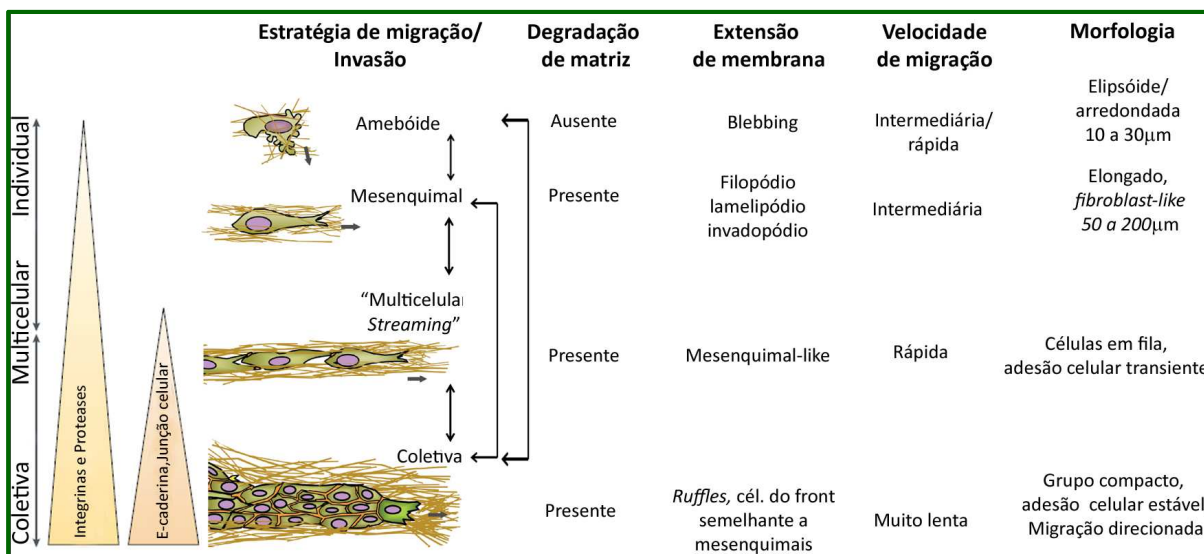


Figura 8: Tipos de migração celular e suas características inerentes. Estratégias de migração utilizadas pelas células tumorais, suas características relacionadas e suas possibilidades de interconversões. Adaptado de (FRIEDL; WOLF, 2003; FRIEDL; WOLF, 2010)

Embora os tipos de migração celular estejam sendo cada vez mais caracterizados quanto ao seu perfil molecular e fenotípico, e seja possível detectar tais células em amostras de pacientes com câncer invasivo, pouco se sabe sobre a influência dos tratamentos na indução de migração e invasão ao longo da resistência terapêutica. Além disso, pouco se sabe sobre a influência de modificações pós-traducionais, como a glicosilação, na modulação dos processos relacionados à aquisição de um fenótipo migratório e invasivo em células que sobrevivem ao tratamento com a radioterapia.

1.6.3 Glicanos e câncer

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum e mais complexa encontrada em proteínas de eucariotos e presume-se que aproximadamente cinquenta por cento de todas as proteínas sejam glicosiladas (APWEILER et al., 1999), sendo o produto gênico de 1% dos genes humanos envolvidos na regulação desse processo (LOWE; MARTH, 2003). A glicosilação envolve complexas reações catalisadas por glicosiltransferases e glicosidades que se encontram ligadas à membrana do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (DELL; MORRIS, 2001). Durante um longo período, estudos no campo da glicobiologia eram focados apenas na questão estrutural, e só recentemente que os trabalhos passaram a investigar o papel funcional dos glicanos, gerando um novo campo na ciência denominado Glicômica Funcional (ZHAO et al., 2008b). Neste contexto, alterações no perfil de glicosilação contribuem para diferentes eventos da progressão tumoral, tais como: proliferação, angiogênese, metástase, evasão da apoptose, perda da adesão célula-matriz e também da adesão célula-célula, uma vez que a glicosilação influencia nas funções biológicas de caderinas e integrinas (MARCUM; ROSENBERG, 1985; GRANOVSKY et al., 2000; NAGY et al., 2002; LAGANA et al., 2006; PINHO et al., 2009a; CROCI et al., 2012). Sendo assim, tanto alterações no perfil de glicosilação quanto na expressão gênica de enzimas que medeiam esse processo, como as glicosiltransferases, têm sido relacionadas à tumorigênese e a eventos relacionados à progressão tumoral, como na metástase e invasividade (YAMAMOTO et al., 2000; FREDMAN et al., 2003; LAU ; DENNIS, 2008). No entanto, apesar de existir uma enorme diversidade estrutural de glicanos, somente um grupo relativamente pequeno de arranjos tem sido associado à tumorigênese, como os pertencentes ao grupo dos *N-ligados*. A N-glicosilação é a transferência de um oligossacarídeo para resíduos do aminoácido asparagina (Asn), desde que estejam presentes na sequência

específica Asn-X-Ser/Thr (asparagina-qualquer aminoácido exceto prolina-serina ou treonina) de polipeptídeos nascentes no retículo endoplasmático. Em seguida, tal oligossacarídeo sofre novos processamentos e adição de novos açúcares ao terminal não redutor do glicano pela ação de glicosiltransferases, formando três estruturas principais de *N*-glicanos: (i) As ricas em manose, representando a fase inicial da síntese de *N*-glicanos, antes da ação de enzimas manosidases; (ii) as híbridas, representando a fase intermediária e apresentando estruturas comuns às ricas em manose e complexas; (iii) e as complexas, que representam a fase tardia, sendo mais comumente bi-antenadas e menos frequentemente tri- ou tetra-antenadas (BERTOZZI ; KIESSLING, 2001; MOREMEN et al., 2012). A Fig. 9 ilustra como os glicanos regulam diferentes aspectos da progressão tumoral e as principais estruturas de *N*-glicanos.

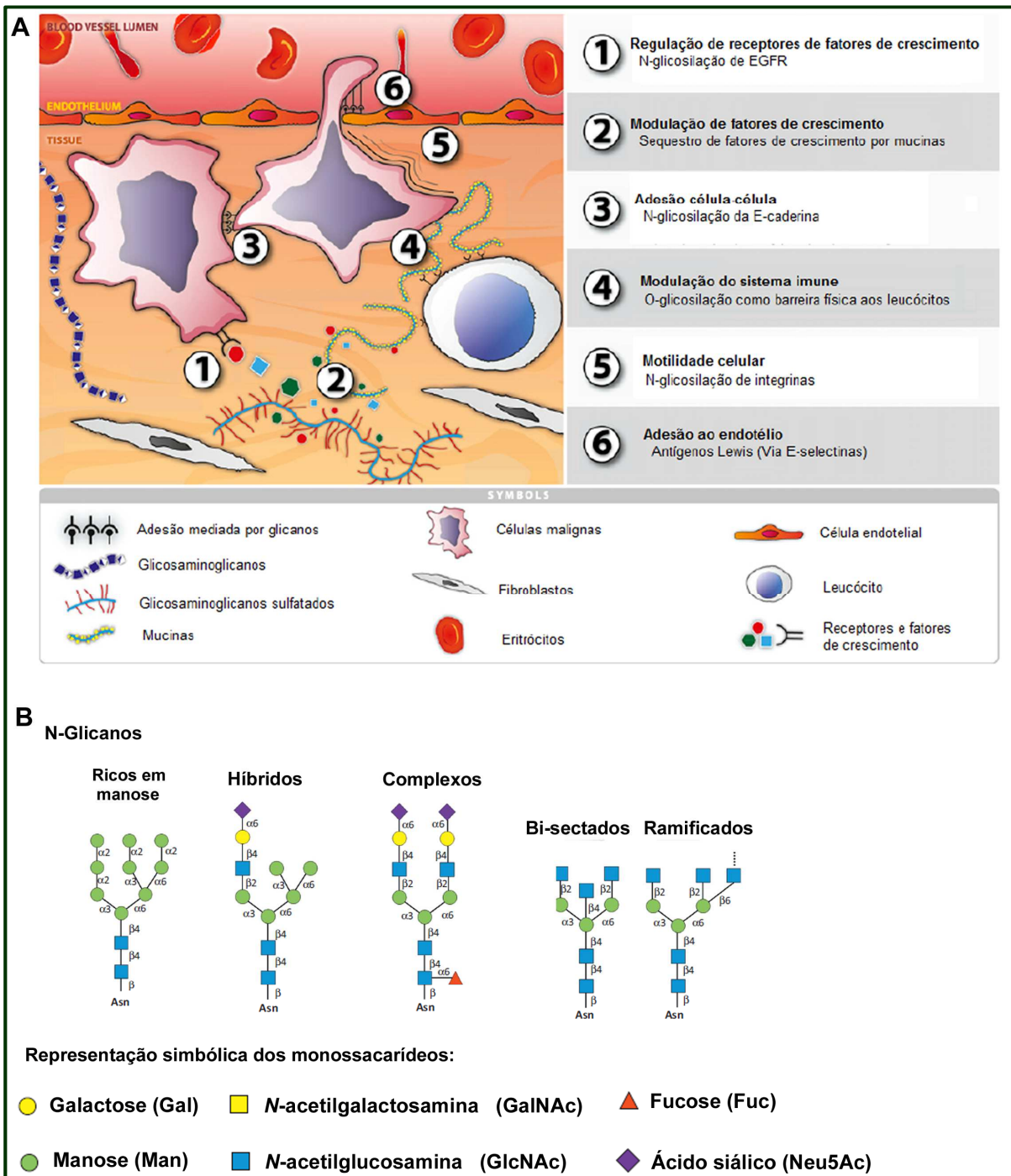


Figura 9: Papel dos glicanos durante a progressão tumoral e os principais tipos de N-Glicanos. A: Duas células metastáticas são ilustradas e seis importantes processos para a progressão tumoral são indicados. **B:** Representação esquemática das estruturas dos N- glicanos. Adaptado de (POTAPENKO et al., 2013a; PINHO et al., 2010).

Neste sentido, uma vez que a estrutura destes glicoconjugados é determinada pela ação de glicosiltransferases e glicosidades – enzimas que catalisam a síntese e a quebra de ligações

glicosídicas, respectivamente – alguns estudos têm demonstrado que alterações na expressão destas enzimas podem modular também a adesão célula-célula. Neste caso, duas enzimas desempenham papéis antagônicos: a *N*-acetilglicosaminiltransferase III (GnT-III) e a *N*-acetilglicosaminiltransferase V (GnT-V) (TANIGUCHI et al., 2006). Existe uma relação entre a expressão de GnT-III e a adesão célula-célula estável mediada por E-caderina (YOSHIMURA et al., 1996; IJIMA et al., 2006; PINHO et al., 2009b), sugerindo um papel supressor de GnT-III sobre o fenótipo maligno. De uma forma oposta, a glicosilação da E-caderina catalizada pela GnT-V está associada a uma destabilização da adesão célula-célula mediada pela E-caderina, contribuindo para a progressão tumoral (PINHO et al., 2013b). Em relação ao prognóstico foi observado que a expressão de GnT-V estava associada a uma redução da sobrevida global em pacientes com CCR (REIS et al., 2010). Além disso, estudos anteriores e também do nosso Grupo vêm mostrando que a inibição de glicosilação *N*-ligada induz tanto a radiosensibilização de células tumorais quanto inibição das sinalizações resultantes de receptores tirosina-quinase, sendo um alvo candidato para reversão de resistência adquirida à esta classe de inibidores (CONTESSA et al., 2008; de-FREITAS-JUNIOR et al., 2012; de-FREITAS-JUNIOR et al., 2013).

Embora a maioria dos estudos correlacione a expressão desses glicanos com a tumorigênese e progressão tumoral, poucos estudos se empenham em avaliar a correlação entre expressão e biossíntese de *N*-glicanos e mecanismos envolvidos na aquisição de resistência terapêutica .

1.7 Tratamentos do câncer colorretal e resistência terapêutica

1.7.1 Tratamentos

No CCR observa-se que em 72% dos casos o tumor acomete o cólon e 28% o reto, porém, estas duas manifestações da doença são reportadas em conjunto (CENTELLES, 2012). Ambos compartilham muitos aspectos como etiologia, diagnóstico, patologia e tratamento de doença metastática, mas devido a questões anatômicas, tanto o tratamento de doença localizada quanto as taxas de recorrência diferem significativamente entre si (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; LÓPEZ-LARA ; DIEZHANDINO GARCÍA, 2011). Porém, um estudo comparando 276 amostras de câncer de cólon e reto e tecido normal (THE CÂNCER GENOME ATLAS NETWORK GENOTYPES-2012) mostrou por diversas análises

(sequenciamento e número de cópias do DNA, perfil de metilação, mRNA e RNAs não codificantes) que os tumores de cólon e reto são indistinguíveis a nível molecular. O estadiamento é essencial para escolha do tratamento e avaliação do prognóstico, sendo o sistema mais utilizado o TNM (do inglês *Tumor–Node–Metastasis*), o qual avalia características como extensão e tamanho do tumor primário, acometimento dos linfonodos próximos à região do tumor e a presença de metástase (EDGE ; COMPTON, 2010).

Durante muitos anos, a cirurgia consistia no único tratamento para CCR avançado. Devido às altas taxas de recorrência, ao longo dos anos foram incorporadas a radioterapia (RT), a quimioterapia (QT) e as terapias alvo, as quais podem ser combinadas em doses e ordem de tratamento, podendo ser neoadjuvante ou adjuvante nos esquemas terapêuticos. A quimioterapia é baseada há décadas, na administração do análogo de pirimidina 5-Fluorouracila (5-FU), tornando-se aceitável o uso da fluorpirimidina oral Campecitabine (pró-droga) devido a sua conveniência de administração e equivalência farmacológica. A oxaliplatina (composto derivado de platina) e o Irinotecano (Inibidor de topoisomerase1) também vêm sendo utilizados em ensaios clínicos e em alguns esquemas terapêuticos, embora seja conflitante o benefício da adição desses medicamentos ao tratamento (PRAMATEFTAKIS et al., 2012). Recentemente, a agência regulatória americana (FDA do inglês, Food and Drug Administration) aprovou para casos e estadiamentos específicos de CCR o uso de terapias alvos como anticorpos monoclonais anti-VEGF (Bevacizumab), anti-EGFR (Cetuximab e Panitumab) e inibidores de quinases, como o Aflibercept e o Regorafenib (inibidores multiquinases), embora ainda não seja conclusivo o benefício do tratamento com essas novas drogas (BENSON et al., 2013; FAKIH, 2013; TEMRAZ et al., 2014). No Brasil, a Portaria nº 601, de 26 de junho de 2012, que Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Cólon e Reto não recomenda o uso de esquemas contendo irinotecano, mitomicina C, bevacizumabe, cetuximabe ou panitumumabe em determinados estadiamentos por não haver demonstração de vantagem clínica em termos de ganho de sobrevida quando comparados aos tratamentos contendo apenas fluoropirimidina. Outros estudos também mostram um aumento da toxicidade do tratamento e um ganho de sobrevida considerado "modesto" para que justifique a utilização de tais novos medicamentos.

Já a radioterapia é uma modalidade terapêutica utilizada na clínica para o tratamento de tumores desde 1897 (PRISE et al., 2005) e é considerada terapia de primeira linha para diversos tumores sólidos, tanto com intenção curativa para cânceres primários como paliativa (YACOUB et al., 2006). Estudos mostram melhores resultados do esquema neoadjuvante em

relação ao adjuvante, com redução da recidiva local, porém, sem nenhum aumento significativo da sobrevida global (VONK ; HAZARD, 2010; YORIO et al., 2012; GLYNNE-JONES, 2012; PACH ET AL., 2012). Os protocolos de RT neoadjuvante consistem em doses hiperfracionadas de 1,8 a 2,0 Gy durante 5 a 7 semanas ou doses hipofracionadas de 5Gy durante 5 dias. Ambos os esquemas de fracionamento são importantes para permitir o reestabelecimento dos tecidos normais entre as exposições, porém, não só as células do tecido normal, mas também as células tumorais podem se reestabelecer e ocorrer uma repopulação de células sobreviventes à radiação. Além disso, metástases refratárias ocorrem frequentemente após a radioterapia (VAN DEN BRINK et al., 2004) e a literatura é inconclusiva em relação ao seu real valor nos esquemas terapêuticos (PACH et al., 2012).

Estudos mostram que a radiação induz a secreção de fatores de crescimento e citocinas no microambiente irradiado, como EGF, TNF α , IL1 (interleucina1), IL6 (interleucina 6) e TGF- β . Além disso, sabe-se que as células não morrem imediatamente após a exposição à radiação e as células sobreviventes continuam interagindo com esse microambiente (BARCELLOS-HOFF et al., 2005; HAMADA et al., 2007), podendo desenvolver respostas radioadaptativas através da ativação de mecanismos de reparo do DNA, sinalizações de *stress* celular e ativação de vias de sobrevivência (AHMED; LI, 2008). Porém, as características fenotípicas e o comportamento dessas células remanescentes e suas progênes é pouco conhecida, uma vez que a grande maioria dos estudos analisam as células diretamente atingidas pela radiação e em tempos curtos, e somente alguns deles que avaliam os efeitos transgeracionais desse tratamento. Estudos prévios mostraram que a radiação induz uma desorganização dos contatos intercelulares em linhagens de câncer colorretal diretamente atingidas pela radiação (de CARVALHO et al., 2006) bem como o desenvolvimento de EMT em modelos de câncer de pulmão (JUNG et al., 2007). Além disso, estudos recentes reportam que a EMT pode ser induzida por fatores de crescimento e citocinas envolvidas na progressão do câncer, como o EGF, TNF- α e TGF- β , os mesmos induzidos pela radiação como mencionado anteriormente (ANDARAWewa et al., 2011; LI et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

1.7.2 Mecanismos de resistência terapêutica

Nos últimos anos têm sido identificados inúmeros mecanismos moleculares que governam o desenvolvimento e progressão dos tumores, proporcionando a aprovação de

vários medicamentos para o tratamento de câncer. Tais medicamentos apresentam benefícios clínicos plausíveis para sua utilização, porém, muitas vezes esses benefícios levam apenas a um aumento modesto da sobrevivência dos pacientes (HUFF et al., 2006). Sendo assim, este amplo entendimento da biologia tumoral ainda não foi suficiente para o desenvolvimento de terapias 100% eficientes e, infelizmente, a maioria dos pacientes apresentam resistência em algum momento ao longo do tratamento (WILSON et al., 2009). A ineficiência de cura do câncer é atribuída à capacidade de repopulação e metástase das células tumorais após o tratamento inicial, mesmo quando não há nenhum sinal detectável de doença ao fim da terapia (MORRISON et al., 2011).

O insucesso terapêutico pode ser devido à resistência intrínseca (através de mutações e mecanismos epigenéticos pré-existentes no tumor) ou via resistência adquirida (seja por mutação induzida ou alteração de expressão proteica, seja via epigenética ou não após a exposição ao tratamento), onde diversos mecanismos estão relacionados com ambas as formas de resistência. Dentre os mais estudados encontram-se aqueles relacionados ao metabolismo da droga, incluindo a alteração da sua captação (via alteração de expressão de receptores, transportadores e de proteínas da junção *tight*, como as claudinas, alterando a entrada de 5-FU, por exemplo, dentro das células) e aumento da detoxificação através de alterações de expressão enzimática do complexo citocromo P450 e enzimas que neutralizam o stress oxidativo causado pelos quimioterápicos ou radioterapia (ZAHREDDINE ; BORDEN, 2013). Por outro lado, o aumento do efluxo de drogas se deve pelo aumento da expressão de bombas de efluxo pertencentes a família ABC (do inglês *ATP Binding Membrane Transporters*). As principais são: a P-gP (produto do gene MDR1) responsável por transportar agentes anti-tumorais hidrofóbicos; a Proteína 1 associada a resistência multidrogas (MRP1), responsável pelo efluxo de drogas carregadas negativamente pela conjugação com a GSH (glutathiona); e a MXR (também conhecida como proteína de resistência do câncer de mama ou proteína ABC da placenta), responsável pela quimiorresistência a diversas drogas, inclusive inibidores de topoisomerasas 1 (GOTTESMAN et al., 2002).

Outro mecanismo importante envolvido na aquisição de resistência terapêutica é o aumento da expressão de membros da família de proteínas anti-apoptóticas (IAPs). Dentre elas, a Survivina está envolvida tanto na inibição da apoptose quanto no controle da progressão do ciclo celular e encontra-se expressa na maioria dos tumores e praticamente ausente em tecidos normais. Sua expressão também é correlacionada à resistência à diversos tratamentos (ALTIERI, D, 2006).

Vias oncogênicas também são integradas com resistência terapêutica e constituem novos alvos terapêuticos, como é o caso do Imatinib, cujo alvo é a tirosina quinase BCR/ABL; a via do EGFR, HER-2, dentre outras (Zahreddine ; Borden, 2013). Outros mecanismos envolvidos são a ativação de vias de sobrevivência, como PI3K e IGFR1; aumento da capacidade de reparo do DNA; perda de função de p53; e desregulação das vias apoptóticas, através do aumento da expressão de IAPs (do inglês *anti-apoptotic protein*) e redução de proteínas apoptóticas (MORRISON et al., 2011; WORKMAN et al., 2013; YARDLEY, 2013). Modificações pós-traducionais de proteínas também vêm sendo relacionadas à mecanismos de resistência, como a adição de ácido siálico na extremidade de glicanos N-ligados (LEE et al., 2008).

Devido às características inerentes ao processo de resistência, estudos sugerem que a origem da falha do tratamento sejam as *Cancer Stem cells*, enquanto outros sugerem que o próprio tratamento exerça uma pressão seletiva no microambiente, induzindo um fenótipo secretório que ao longo do tratamento, ativam os mecanismos mencionados acima e até mesmo, a EMT e características de SC (ALEXANDER ; FRIEDL, 2012).

1.8 Justificativa do estudo:

Embora muitos mecanismos de resistência já tenham sido descritos e novos medicamentos vem sendo desenvolvidos, poucos avanços no tratamento do CCR foram obtidos, sendo necessário a identificação de vias ativadas pela radioterapia que modulam o fenótipo celular em processos relacionados à repopulação do tumor e aquisição de metástase, com intuito de fornecer potenciais alvos terapêuticos.

Sendo assim, a ocorrência de metástase após a radioterapia; o fato de o sucesso terapêutico ser desafiado pela capacidade de sobrevivência e invasividade das células remanescentes que não são erradicadas pelo tratamento; e que não é conhecido o comportamento dessas células após o tratamento com a radiação; torna-se de suma importância analisar os mecanismos celulares e moleculares que regulam a sobrevivência das progênes derivadas de células sobreviventes ao tratamento com a radiação. Além disso, a caracterização dessas subpopulações pode auxiliar no entendimento do processo de aquisição de resistência ao tratamento e propor novos alvos para evitar o insucesso terapêutico do CCR.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos induzidos pela radiação gama (5Gy) e avaliar o quanto tais efeitos poderiam influenciar nas características malignas da progênie derivada de células de câncer colorretal humano (Caco-2, HT-29 e HCT-116) irradiadas, bem como avaliar o perfil de glicosilação na progênie mais invasiva, F1 5Gy HT-29.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Analisar a radiosensibilidade das linhagens utilizadas no estudo, bem como a capacidade clonogênica das células sobreviventes;

2.2.2 Avaliar o fenótipo da progênie proveniente das células irradiadas e suas alterações morfológicas em relação à adesão celular e a organização do citoesqueleto;

2.2.3 Analisar o potencial migratório e invasivo da progênie derivada de células irradiadas;

2.2.4 Avaliar potenciais vias de sinalização relacionadas ao fenótipo adquirido,

2.2.5 Analisar o perfil de expressão gênica relacionada ao desenvolvimento de um fenótipo mais agressivo.

2.2.6 Avaliar o perfil de glicosilação global da progênie mais invasiva, F1 HT-29

2.2.7 Avaliar o perfil de glicosilação da molécula de E-caderina nas progênies F1 Controle e F1 5Gy HT-29

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material

O anticorpo monoclonal mouse anti- α -tubulina foi adquirido da Invitrogen Inc. (Carlsbad, CA, EUA). O anticorpo monoclonal mouse anti-E-caderina (clone 36) foi adquirido da BD Biosciences (San Diego, CA, EUA). Os anticorpos rabbitanti - β - catenina, p-GSK3 β (Ser-9) (5B3), anti - GSK3 β monoclonal (27C10) e anti-GAPDH (14C10) foram adquiridos da Cell Signaling (Danvers, MA, EUA). O anticorpo rabbit anti-survivina foi adquirido da R&D System (Minneapolis, MN, EUA). Anticorpo Alexa Fluor® 488 IgG-goat-anti-mouse e Alexa Fluor® 546 IgG-goat-anti-rabbit foram obtidos da Molecular Probes (Eugene, Oregon, USA). Anti mouse e anti-rabbit IgG conjugado a HRP foram adquiridos da GE Healthcare (Chalfont St Giles, Reino Unido). O anticorpo monoclonal vimentina anti-mouse (clone V9), Faloidina conjugada à rodamina isotiocianato (Cat. P1951), anticorpo monoclonal anti-vimentina conjugado a Cy3 (Cat. C9080) e 4' dicloridrato de 6 - diamidino - 2 - fenilindole (DAPI;) foram adquiridos da Sigma - Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As lectinas biotinizadas *Phaseolus vulgaris leucoagglutinin* (L-PHA) foram adquiridas da Vector Laboratories, EUA.

3.2 Cultura de células e tratamento com radiação

Linhas celulares de adenocarcinoma colorrectal humano Caco-2 (HTB-37 TM) e HT - 29 (HTB-38 TM) e de carcinoma colorrectal humano HCT-116 (CCL-247 TM) foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA). As células Caco-2 apresentam mutação em *APC*, *TP53* e *SMAD4* e possuem baixo potencial invasivo e metastático, com um fenótipo diferenciado quando formam uma monocamada confluenta. Já as células HT-29 são moderadamente diferenciadas, com mutações em *BRAF*, *PIK3CA*, *TP53*, *SMAD4* e *APC* (ROWAN et al., 2000; FLATMARK et al., 2004). As células HCT-116 apresentam mutações em *KRAS*, *PIK3CA* e β - catenina, sendo *TP53 wild type*, com um fenótipo indiferenciado e alto potencial tumorigênico (AHMED et al., 2013). As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO - Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina G (100 mg/L) e estreptomicina (60 mg/L), a 37 ° C em estufa com 5 % CO₂/ 95% de O₂. As células em subconfluência foram expostas a uma única dose de radiação (5Gy) a 25 ° C utilizando um irradiador gama de ¹³⁷Cs (IBL 437C, CIS bio International) a uma taxa de dose de 2,65 Gy / min. As células controle (não irradiadas) foram mantidas em meio DMEM

e as células irradiadas mantidas em confinamento com o mesmo meio irradiado durante 24 h. Após este tempo, as células controle e irradiadas foram tripsinizadas (com 0,05% de tripsina / 0,02% de EDTA diluídos em PBS); plaqueadas em baixa densidade e mantidas até a formação de colônias progênicas e então submetidas aos experimentos seguintes. A progênie derivada de células não irradiadas foram chamadas de " F1 Controle", e a progênie de células irradiadas foram chamadas de "F1 5Gy". Para fins experimentais, as células foram mantidas em garrafas de cultura, placas, lamínulas de vidro ou em insertos de membrana de policarbonato Transwell ® (poros de 8 µm) (Costar Cambridge, MA) revestidas com Matrigel ® (BD Biosciences, San Diego, CA , EUA). O meio de DMEM no qual as progênicas de células HT-29 irradiadas ou controles foram cultivadas foi chamado meio condicionado (MC).

3.3 Ensaio clonogênico

Progênicas derivadas de células parentais irradiadas e controles (Caco-2, HT-29 e HCT-116) foram cultivadas em densidade baixa ($2,5 \times 10^2$ células) em placas de 12 poços, durante sete dias, para determinar o efeito da irradiação sobre o potencial clonogênico. Em seguida, as colônias foram fixadas com etanol 100% (10 minutos), coradas com uma solução de cristal violeta (0,05 % de cristal violeta e 20 % de etanol) durante 10 min, lavadas com água e em seguida, o corante foi solubilizado em metanol 10%. A absorbância a 595 nm foi medida em um espectrofotômetro Spectra Max 190 (Molecular Devices, Sunny vale, CA, EUA), e as barras dos gráficos representadas como percentagem de formação de colônias a partir da densidade óptica obtida, onde o controle = 100%. Dados representativos de três experimentos independentes.

3.4 Atividade de caspase

A atividade de caspase foi monitorada nas progênicas derivadas de células parentais irradiadas e controles (Caco-2, HT-29 e HCT-116) usando o kit Caspase-Glo assay® 3/7 (Promega, Madison, WI, EUA) de acordo as indicações do fabricante. A luminescência foi mensurada em um luminômetro Veritas (Turner Biosystems, Inc. Sunny vale, CA, EUA). Os dados foram plotados como o índice de ativação caspase 3,7 (F1 5Gy/F1 Controle).

3.5 Obtenção de lisados celulares e *Immunoblotting*

As progênies de células parentais irradiadas e controles (Caco-2, HT-29 e HCT-116) foram homogeneizadas em tampão de lise (1 % Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,2 % SDS, NaCl 150 mM , EDTA a 2 mM , Hepes 10 mM, pH 7,4) contendo NaF 20 mM, ortovanadato de sódio 1 mM e coquetel de inibidores de protease (1:100) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA) durante 30 min a 4°C. Os lisados celulares foram submetidos a centrifugação (10.000 g/10 min; 4°C) e os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -80°C para análise subsequente. Quantidades iguais de proteína (30µg/µL) provenientes dos lisados celulares foram separadas por SDS-PAGE em géis de poliacrilamida (10% e 13 %). Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, incubadas em tampão de bloqueio (5% de leite desnatado em solução de TBS-Tween 0,1% durante 1 h. Em seguida, foram incubadas *overnight* com anticorpos primários anti-E-caderina (1:5000) , anti-β-catenina (1:4000), anti-vimentina (1:1000), anti-fosfo-GSK3β (1:1000), anti-GSK3β total (1:1000) e anti-survivina (1:1000). Após sucessivas lavagens , as membranas foram incubadas por 1 h com anticorpos secundário correspondentes, anti-*mouse* ou anti-*rabbit* conjugados à peroxidase, na diluição de 1:10000 em TBS-T0,01%, por 60 min. As membranas foram lavadas com TBS-T 0,1%, e a detecção da imunomarcção foi realizada através de reação de quimioluminescência, utilizando o kit ECL (Amersham Biosciences GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido). A quantificação dos níveis proteicos foi realizada por análise densitométrica usando *software* LabWorks 4.6 (BIO RAD, Upland, CA, EUA). Anti- α - tubulina (1:500) ou anti - GAPDH (1:1000) foram usados como *housekeeping*.

3.6 Imunofluorescência e Fluorescência direta

Células F1 controle e F1 5Gy foram cultivadas sobre lamínulas de vidro até a formação de colônias;lavadas com PBS e fixadas com metanol 100% durante 20 min a -20° C. Depois foram lavadas e re-hidratadas com PBS/CM (PBS contendo CaCl₂ 100 mM e MgCl₂ 100 mM, pH 8,0). Posteriormente, foram bloqueadas com 0,2% BSA e permeabilizadas com 0.1% Triton X-100 (60 min). Logo após, foram incubadas *overnight* com os anticorpos primários anti E-caderina (1:300), anti β-catenina (1:200) ou com lectinas anti-LPHA (1:100), seguidas de 1h de incubação com seus respectivos anticorpos secundários conjugados a Alexa fluor 488 ou 546 (diluição 1:500), no caso das imunofluorecências indiretas. Para imunofluorecência direta, utilizou-se anticorpo anti-vimentina conjugada a Cy3 (1:100; 40 min) e para fluorescência direta, utilizou-se Faloidina conjugada à TRITC 500 ng/mL (40

min) , sendo previamente fixadas em 4% de paraformaldeído e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100. Em seguida, todas as lamínulas foram incubadas com DAPI (1:1000; 1 min muito tempo), lavadas e montadas utilizando n-propil-galato (Sigma Aldrich, USA), sendo visualizadas em microscópio confocal a laser , FV10i-O. As imagens foram analisadas usando o software FV10-ASW (Olympus, Tokyo, Japan). As imagens são representativas de três experimentos independentes.

3.7 Análise da migração celular (*Wound healing assay*)

F1 5Gy e F1 Controle de Caco-2 e HT-29 foram cultivadas em placas de 24 poços até atingirem a confluência e submetidas a um risco com ponteira estéril. Para cada poço, cinco campos ao longo da extensão do risco foram selecionados, marcados e analisados em microscópio Axio Observer. Z1 equipado com um Axio Cam HRc e Axio Vision Release 8.2 Image Analyzer (Carl Zeiss , Inc., Jena, Alemanha). Em seguida, as células foram incubadas durante 24 h para permitir que as células migrassem pela abertura na monocamada formada pelo risco. As captações das imagens foram feitas imediatamente após o risco (t = 0 h) e no final do experimento (t= 24 h). A quantificação da migração foi realizada através de medições da distância entre as duas bordas da lesão através do programa Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc., CA, EUA). Os valores de migração celular estão representados como a percentagem de migração (que correspondem ao fechamento da lesão produzida na monocamada), sendo as barras dos gráficos correspondentes a médias \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular, de pelo menos, três experimentos independentes.

3.8 Ensaio de invasão celular

Para o ensaio de invasão celular, células HT-29 F1 5Gy e Controle F1 (3×10^4) foram cultivadas na superfície superior de insertos de membrana de policarbonato Transwell ® (poro de 8 μ m; Costar), revestido com 20 μ L de Matrigel ® (BD Biosciences) diluído 1:10 em 200 μ l de DMEM isento de SFB. Utilizou-se meio DMEM suplementado com 10% de SFB como um quimioatraente na parte inferior da câmara, e após 24 h de incubação a 37° C, o gel que revestia a superfície superior da membrana foi retirado com uma haste de algodão, uma vez que as células que atravessaram o gel são aquelas que invadiram e conseqüentemente encontram-se na parte inferior da membrana. A membrana foi então fixada com etanol 100%

(10 min), coradas com violeta de cristal e analisadas ao microscópio Axio Observer Z1. O número de células que invadiram foi expresso como a média de quatro campos aleatórios analisados sob o microscópio. Os valores são representados no gráfico como o número de vezes que a F1 5Gy invadiu em relação ao controle (onde os dados do F1 Controle foram normalizados para 1) e correspondem a média \pm SEM de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

3.9 Zimografia

40 μ g de proteínas provenientes do meio condicionado de HT-29 F1 Controle e F1 5Gy foram submetidas a eletroforese em gel de acrilamida (10%) contendo 0,2% de gelatina (Porcine skin, tipo A, Sigma-Aldrich). Após a eletroforese, os géis foram incubados com tampão de lavagem (10 mM Tris / HCl, pH 8,8 contendo 2,5% de Triton X-100) 2 vezes, por 30 min cada, em temperatura ambiente e em seguida incubadas em tampão de ativação (5 mM de CaCl₂, 0,02% de NaN₃, e 50 mM Tris / HCl, pH 8,0) a 37 ° C *overnight*. Em seguida, os géis foram corados com Comassie Azul Brilhante R-250 e incubados em solução descorante (10% (v/v) de ácido acético e 40% (v/v) de metanol). A atividade gelatinolítica das metaloproteases (MMPs) foi detectada através da visualização bandas não coradas sobre o fundo azul nos géis digitalizados.

3.10 Ensaio de atividade transcricional de TCF / LEF por gene repórter

Para analisar a atividade transcricional de β -catenina na progênie, avaliamos a ativação do fator de células T (TCF) / fator potenciador linfóide (LEF) da família de fatores de transcrição (TCF/LEF) através do kit o Dual-luciferase Reporter Assay System ® (Promega, Madison, WI, EUA). Foram utilizados dois plasmídeos de TCF neste ensaio, sendo um deles com o domínio de ligação para a β -catenina *wild type TCF-luciferase construct* (TOP flash) e outro com o domínio de ligação para a β -catenina mutado (FOP flash), o qual foi utilizado como um controle negativo para a atividade TOP flash. HT-29 F1 controle e F1 5Gy foram cultivadas (2×10^3) em uma placa de 24 poços até a sub-confluência. Em seguida, as células foram co-transfectadas transitoriamente com SUPER 8X TOP FLASH β -catenina luciferase (2 μ g) e PRL-TK (Renila-0,2 μ g) ou plasmídeos SUPER 8X FOP FLASH β -catenina luciferase (2 μ g) e plasmídeos PRL-TK (Renila 0.2 μ g). Ambas foram realizadas com o

Reagente de Transfecção FuGENE® HD (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante. A atividade luciferase tanto da Renila quanto das condições de tratamento foram mensuradas 24 h após a transfecção utilizando os reagentes do kit Glo (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante, num luminômetro Veritas (Promega). Os resultados foram normalizados (atividade TOP / atividade Rel) / (atividade FOP / atividade Rel) e as atividades repórter TCF/LEF foram plotadas. Os valores são representados no gráfico como o número de vezes que a F1 5Gy aumentou a atividade luciferase em relação ao controle (onde os dados do Controle F1 foram normalizados para 1) e correspondem a média \pm SEM de ensaios em triplicata, em três experimentos independentes.

3.11 Extração de RNA e qRT-PCR

Alterações na expressão de RNAm de E-caderina, Snail, Slug, Twist, Vimentina, Fibronectina e N-caderina foram avaliados por qRT-PCR. Progênie de HT-29 F1 controle e F1 5Gy foram submetidas a extração de RNAm com o reagente Trizol® (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante e armazenados a -80°C . 2 μg de RNAm total foram submetidos ao tratamento com DNase (Invitrogen) para descontaminação de possíveis DNAs. Em seguida, seguiu-se à transcrição reversa e síntese do cDNA através do kit Superscript II (Invitrogen) e Oligo-dT18 (Invitrogen). As reações foram realizadas utilizando o kit de SYBR Green PCR (Qiagen) num termociclador Rotor Gene Q (Qiagen) (amplificação inicial de 10 min a 95°C , seguido de 45 ciclos de 20s a 95°C , 30s a 60°C , e 30s a 72°C). A normalização foi feita com o gene *housekeeping ACTA1* (α -actina) e os dados foram representados como número de vezes de aumento da transcrição em relação ao controle. Os dados são apresentados como médias \pm SEM de ensaios em duplicata de três experimentos independentes. Os primers utilizados encontram-se na tabela abaixo:

Primer	Tipo	Sequência
α-Actina	Forward	5'-TACAATGAGCTGCGTGTGG-3'
	Reverse	5'-TAGCACAGCCTGGATAGCAA-3'
E-caderina	Forward	5'-TGGCGTCT GTAGGAAGGCA'-3'
	Reverse	5'-GGCTCTTTGACCACCGCTCT-3'
Snail	Forward	5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3'
	Reverse	5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3'
Slug	Forward	5' AAGCATTTC AACGCCTCCAAA-3'
	Reverse	5'-GGATCTCTGGTTGTGGTATGACA-3'
Twist	Forward	5'-GGCACCATCCTCACACCTCT-3'
	Reverse	5'-TGGCTGATTGGCAGCAGCT-3'
Vimentina	Forward	5'-GCCAGATGCGTGAAATGGAA-3'
	Reverse	5'-CTGTCCATCTCTAGTTTCAACCG-3'
Fibronectina	Forward	5'-CACCTTGAATGACAATGCTCGGAG-3'
	Reverse	5'-GACCCAGGCTTCTCATACTTGATG-3'
N-caderina	Forward	5'-ACCAGGACTATGACTTGAGCC-3'
	Reverse	5'-GGCGTGGATGGGTCTTTCA-3'.

3.12 Imunoprecipitação e *blotting* de lectinas.

Para imunoprecipitação quantidades iguais de proteína (750 µg) dos lisados celulares foram *pre-cleared* com 25µl de proteína G conjugada a esferas de sefarose (Sigma-Aldrich Co.) por 1 hora. Após a centrifugação, o sobrenadante foi incubado *overnight* com 5 µg de anticorpo primário Anti E-caderina (BD Bioscience) Em seguida, o sobrenadante foi incubado com proteína G conjugada a *esferas de sefarose* por 2 horas. Para dissociação, as esferas foram lavadas 3 vezes com PBS e os imunocomplexos foram aquecidos a 95°C em tampão de amostra Laemmli (Laemmli, 1970) por 5 min. As amostras foram então separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE usando géis na concentração de 7,5% e transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando-se um aparelho de eletrotransferência úmido (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 50 V por 60 min. As membranas foram mantidas em tampão de bloqueio TBS-T (Tris-HCl, 20 mM, pH 7,6, NaCl 137 mM e Tween 20 0,1% - Sigma-Aldrich Co.) contendo leite desnatado 5%, durante 60 min em agitador orbital. Em seguida, foram incubadas com o anticorpo primário E-caderina e secundário anti mouse conjugado a HRP (GE Healthcare) ou lectinas L-PHA biotinizadas (Vector Laboratories) por 2 horas ou *overnight*. As lectinas do tipo L-PHA reconhecem carboidratos *N*-ligados do tipo β1,6, os quais constituem produtos da enzima GnT-V, mencionada anteriormente. Finalmente, as membranas foram lavadas 5 vezes em TBS-T e a reatividade para as proteínas ou carboidratos

em estudo foi determinada utilizando-se um kit comercial de quimioluminescência (Amersham Biosciences GE healthcare) ou Vector stain ABC kit (Vector Lab.).

3.13 Eletroforese de gel 2D

Quantidades iguais de proteínas dos lisados totais (200 µg) foram precipitadas com tampão de precipitação (Proteo Extract, Calbiochem) e resuspensas em tampão de reidratação (7 M uréia, 2 M thiouréia, 4% (v/v) CHAPS, e 0.0002% azul de bromofenol) com 0.2% de anfolite. e aplicadas nas *strips* (Bio Rad Co.), para proceder à etapa da Primeira Dimensão. As *strips* foram submetidas à reidratação passiva *overnight* utilizando-se *strips* IPG de pH 3–10 NL (Ready Strip; 0.5 mm × 3 mm × 70 mm, Bio-Rad, Hercules, CA) à temperatura ambiente. A focalização isoeétrica foi realizada no Protean IEF cell (Bio-Rad) com uma voltagem inicial de 250 V/15 min e depois aplicou-se um gradiente de voltagem até 4000 V, com corrente máxima de 50 µA por *strip*, à temperatura de 20° C. A primeira dimensão foi concluída a 14–20 kWh. Após a focalização isoeétrica, as proteínas foram reduzidas e submetidas ao tratamento com agente alquilante (2% DL-dithiothreitol (DTT) seguida de incubação em tampão (2.5% iodoacetamida em um tampão de equilíbrio (6 M uréia, 2% SDS, 0.002% azul de bromofenol, 75 mM Tris pH 8.8, 29.3% glicerol) por 10 min sob agitação. As *strips* com as proteínas separadas pelo seu ponto isoeletrico foram então adicionadas em um gel *stacking* de baixa porcentagem de agarose (1% agarose) e adicionou-se tampão de corrida (25 mM Tris, 192 mM glicine, e 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3; Bio-Rad) na parte superior de uma gel de 10% acrilamida (acrilamide/bisacrilamide 37.5:1, 2.6%, Bio-Rad). A eletroforese da segunda dimensão foi realizada no equipamento Mini-Protean tetra cell system (Bio-Rad), utilizando-se tampão 1xTris/glicina/SDS sob voltagem constante de 125 V. Um gel de cada condição experimental foi reservado para a proteômica e outros dois foram direcionados à transferência para membrana de nitrocelulose, como descrito no item 3.5 e submetidas ao *blotting* de lectinas (descrito no item 3.12) e E-caderina (descrito no item 3.5).

3.14 Análise estatística

Todos os dados quantitativos apresentados são médias ± SEM de, pelo menos, três experimentos independentes. A análise estatística e os gráficos de barras foram realizados no programa GraphPad™Prism, 5.0 (GraphPad™ Software, San Diego, CA, EUA) através do

teste-*t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4 RESULTADOS

4.1 Progênies de células de câncer colorretal derivadas de parentais irradiadas apresentam níveis diferenciais de radiosensibilidade que estão diretamente correlacionadas com a ativação de caspases

Com intuito de avaliar a radiorresposta de células derivadas de CCR, três linhagens celulares (Caco-2, HT-29 e HCT-116) foram irradiadas em subconfluência, confinadas no meio irradiado durante 24h, tripsinizadas e cultivadas em baixa densidade para permitir a formação de colônias progênies derivadas de *single cells* sobreviventes ao tratamento. Inicialmente foi avaliado o nível de radiorresistência das linhagens celulares através do ensaio clonogênico e observou-se que dentre as três linhagens celulares utilizadas, a Caco-2 foi mais radiorresistente do que a HT-29 e HCT-116, nesta ordem (Fig.10A). Este resultado foi complementado pelo ensaio de Caspase-GLo®, que mostrou uma indução diferencial de caspases -3 e -7 nessas células. A progênie derivada da linhagem Caco-2 irradiada apresenta uma indução mínima das caspases -3 e -7, enquanto que a progênie derivada de células HT-29 irradiadas mostraram uma indução intermediária. Já a progênie derivada de células HCT-116 irradiadas apresentaram um maior índice de indução dessas caspases (Fig.10B) quando comparadas com suas respectivas progênies controles. Juntos, estes resultados indicam que as células Caco-2 e HT-29 são mais radiorresistentes do que a HCT-116 e esta radiorresistência poderia ser correlacionada com a menor indução de atividade caspase.

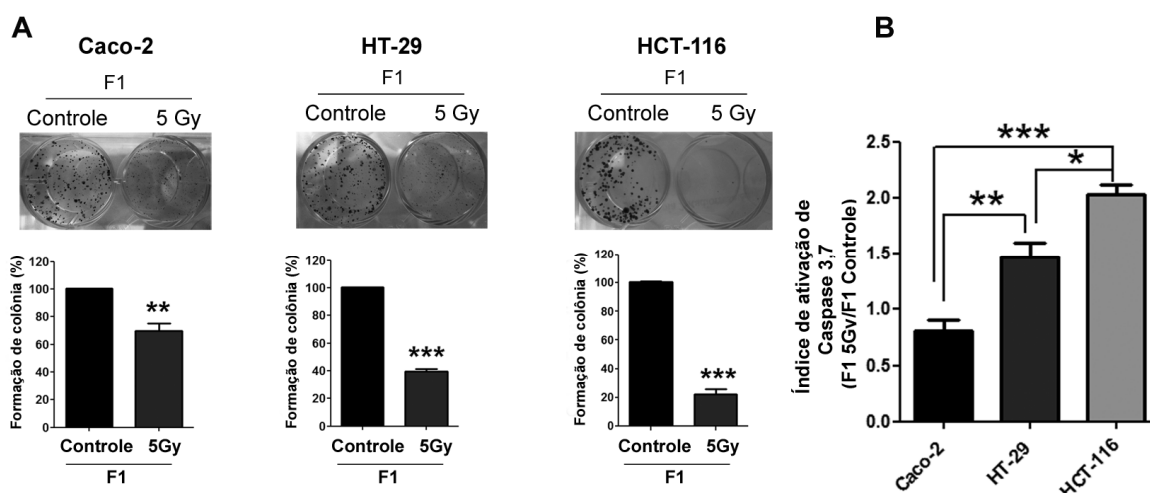


Figura 10. Análise da radiosensibilidade das células de CCR Caco- 2 HT- 29 e HCT- 116 e a sobrevivência de suas progênes. **A:** Imagens representativas do ensaio clonogênico de F1 Controle e F1 5Gy de células Caco-2, HT-29 e HCT-116. Os gráficos estão representados como a porcentagem de formação de colônias após a medida da densidade óptica (595 nm). **B:** Análise da ativação de caspase 3 e 7 através do kit Caspase Glo®. Os gráficos são representativos do índice de ativação (F1 5Gy/F1 Controle) de Caco- 2 , HT- 29 e HCT-116. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes.

4.2 Progênes derivadas de células de câncer colorretal sobreviventes à radiação apresentam aumento da expressão de survivina.

Uma vez que a survivina (membro das proteínas inibitórias de apoptose, IAPs) suprime a apoptose através da inibição direta ou indireta de proteínas relacionadas à caspase (SAH et al., 2006), foi analisado se a expressão de survivina estaria correlacionada com a indução diferencial de caspase nos nossos modelos de estudo. Observou-se que as proles mais resistentes, F1 5Gy Caco -2 e HT-29, mostraram um aumento da expressão de survivina, enquanto que a F1 5Gy HCT -116 (mais radiosensível) mostrou uma redução da expressão desta proteína (Fig.11), indicando que a expressão de survivina poderia corroborar os resultados de radorresposta observados na Fig.10, estando diretamente relacionada com a sobrevivência das progênes.

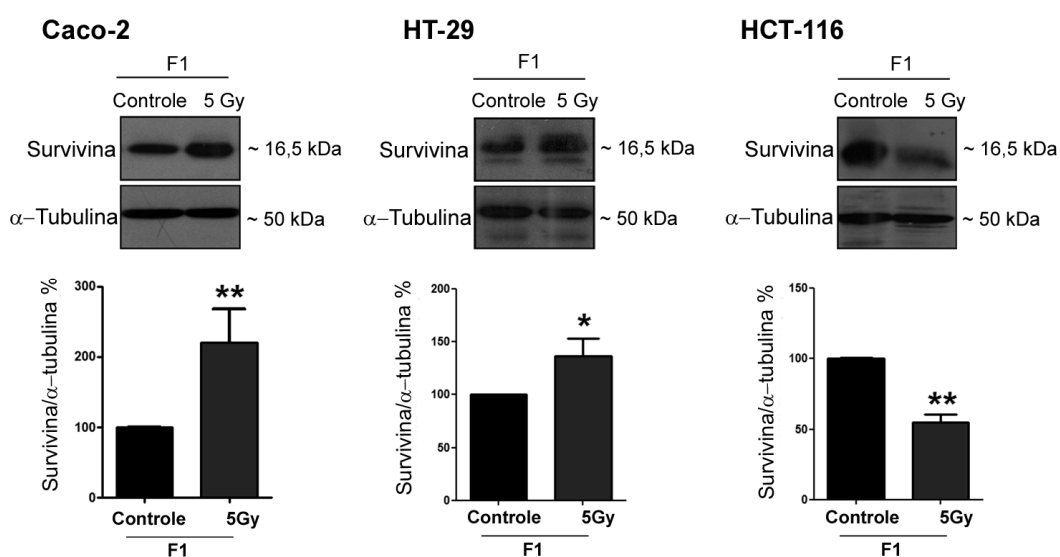


Figura 11: Análise da expressão de survivina em lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2, HT-29 e HCT-116. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem da expressão da proteína survivina em relação ao controle (F1Controle = 100 %). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3 Progênies derivadas das células mais radiorresistentes exibem morfologia celular anormal

Uma vez que as progênies de Caco-2 e HT-29 foram as células com maior capacidade de sobrevivência e formação de colônia após a irradiação, os experimentos subsequentes foram realizados com ambas as linhas celulares com intuito de analisar o comportamento fenotípico das suas progênies. Estudos anteriores mostraram que a radiação induziu alterações morfológicas em células epiteliais em tempos curtos após o tratamento (de CARVALHO et al., 2006; ANDARAWEDA et al., 2007). No entanto, são raros os estudos que focam na progênie sobrevivente em momentos tardios após o tratamento com a radiação (LAGADEC et al., 2012). A morfologia de ambas as progênies F1 5Gy de Caco-2 e HT-29, quando analisados por microscopia de contrastes de fases, apresentaram uma formação de colônias aberrantes quando comparadas às suas respectivas F1 controles (Fig.12). A F1 5Gy de Caco-2 apresenta aumento no volume celular e formação de projeções de membranas sugestivas de

lamelipódios, no entanto, um certo padrão de adesão entre as células na colônia foi mantido, mesmo após 5 dias em cultura. As colônias de F1 5Gy de HT-29 mostram uma intensa dispersão celular e aquisição de uma morfologia fibroblástica em relação a sua respectiva F1 controle. Sendo assim, este resultado mostra que o tratamento com a radiação nas células parentais induziu a formação de colônias com fenótipo extremamente aberrantes na progênie derivada das células que sobrevivem ao tratamento.

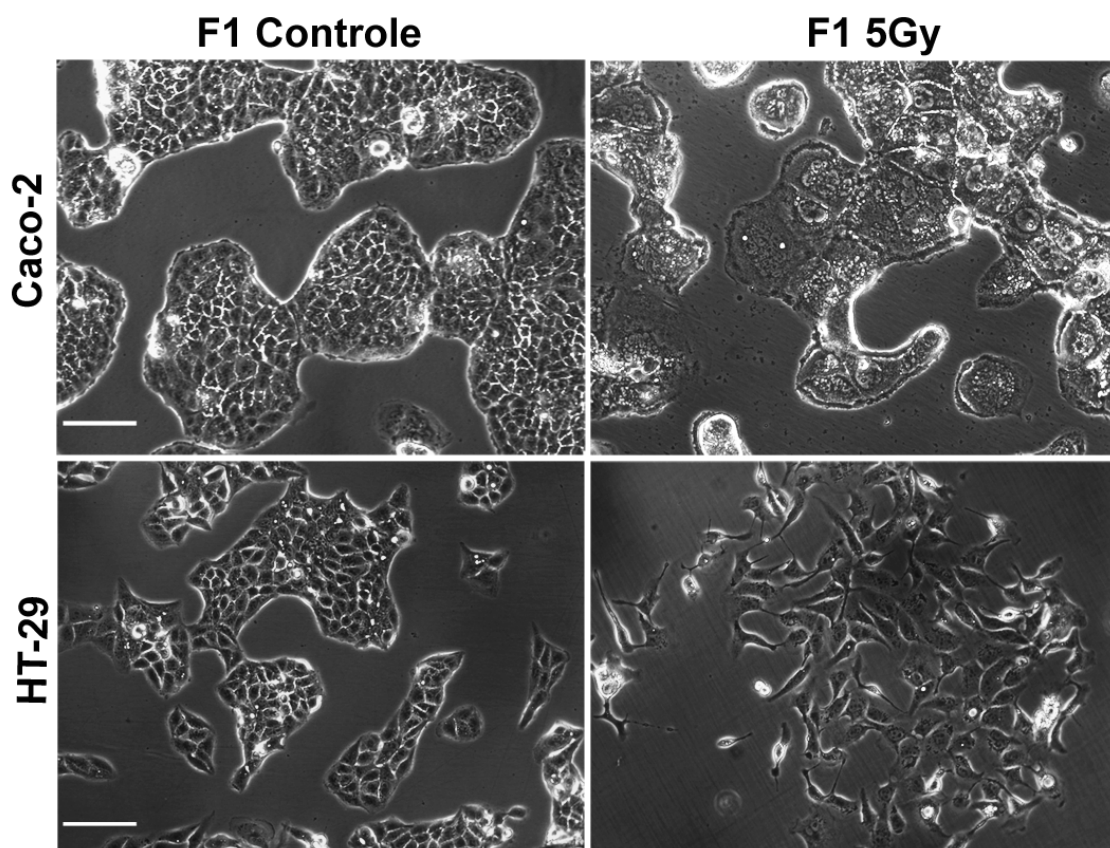
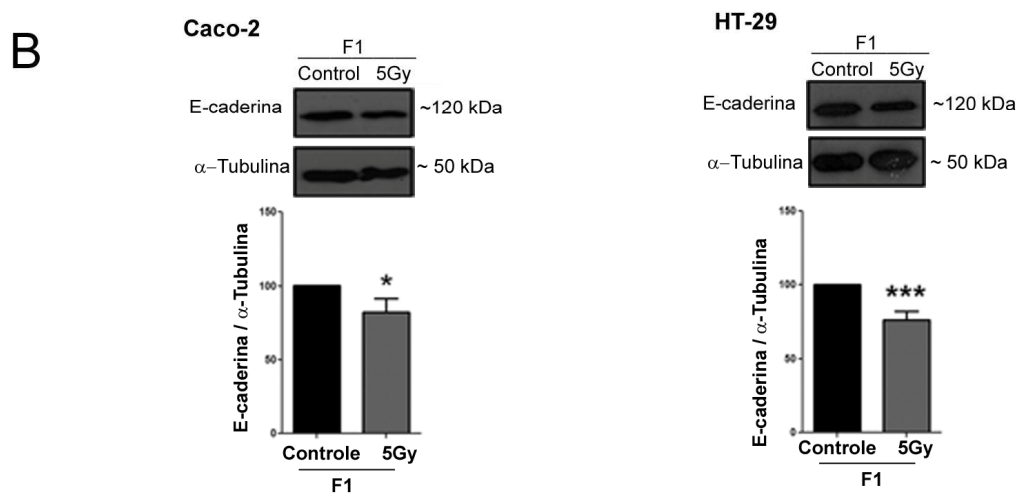
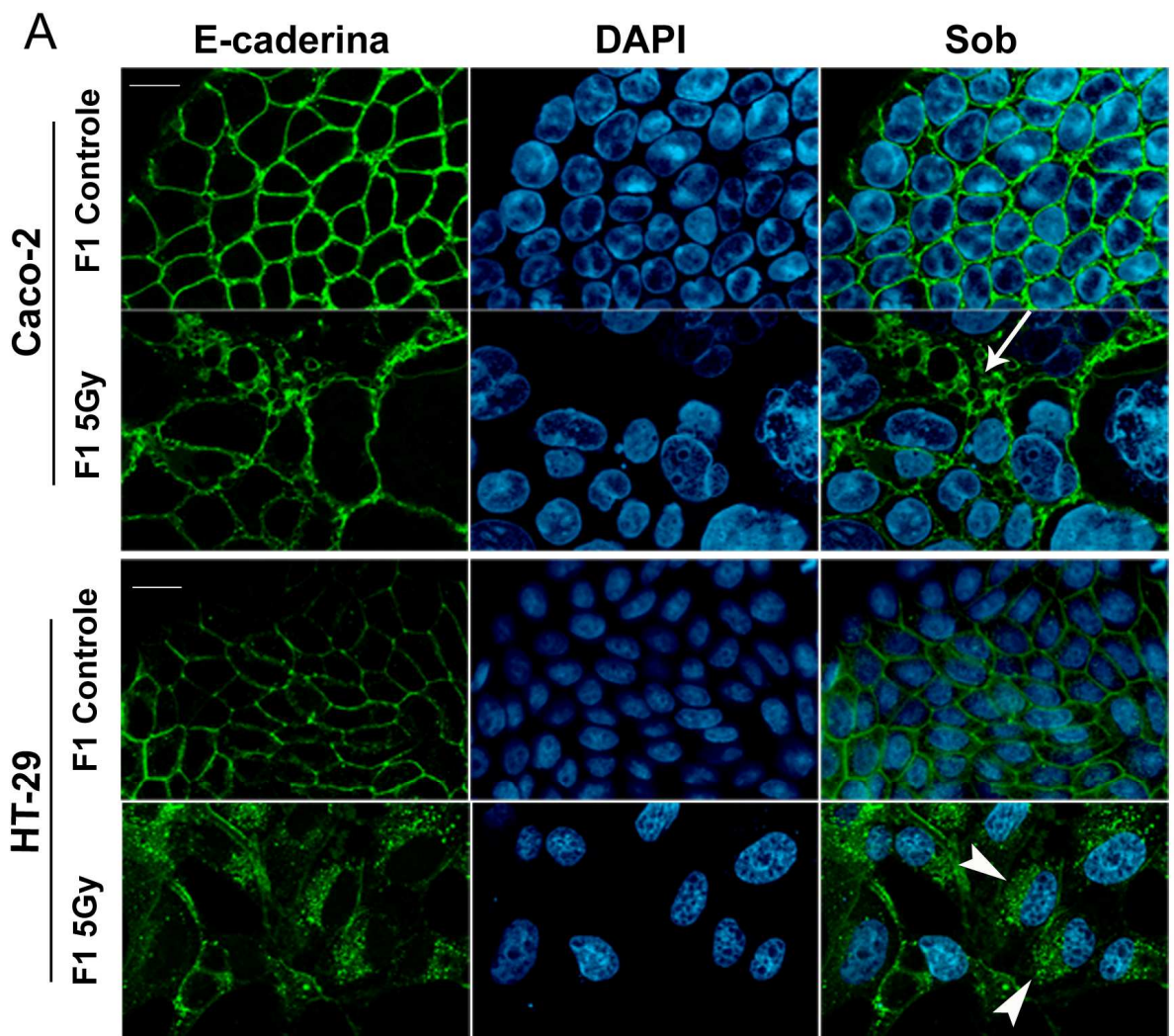


Figura 12. Análise morfológica da progênie derivada de células parentais irradiadas Caco-2 e HT-29. A morfologia celular da F1 Controle e F1 5 Gy de Caco-2 e HT-29 foi analisada por microscopia de contraste de fase. Imagens representativas de 3 experimentos independentes. Barra: 50 μ m.

4.4 A radiação altera a localização subcelular e expressão do marcador epitelial E-caderina nas progênes derivadas de células sobreviventes à radiação.

As proteínas do complexo juncional são cruciais para a manutenção da arquitetura epitelial e alterações em sua expressão e localização estão envolvidas na progressão de diversos cânceres epiteliais. Uma vez observada a intensa alteração na morfologia celular das progênes F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 (Fig.12), analisou-se a localização subcelular e a expressão do marcador epitelial E-caderina (Fig.13) nas progênes. Imagens de imunofluorescência (Fig. 13A) obtidas por microscopia confocal mostram uma marcação bem definida nos contatos célula-célula de E-caderina na F1 controle Caco -2 e F1 Controle HT-29. No entanto, as progênes derivadas de células parentais irradiadas apresentaram alterações na localização subcelular destas proteínas de adesão celular. Observa-se um perfil de marcação descontínuo na F1 5Gy de Caco-2, porém com alguma marcação para E-caderina ainda mantidas no contato celular. Além disso, foi possível observar um perfil de marcação vesicular no citoplasma indicando um possível internalização de E-caderina. Já as células da F1 5Gy de HT-29, as quais mostraram uma pronunciada dispersão celular, apresentam também uma intensa localização perinuclear da E-caderina (Fig.13A). Além da localização subcelular, foi avaliada também os níveis de expressão de E-caderina por *immunoblotting* (Fig.13B) e foi observada uma redução significativa dessa proteína em ambas as progênes analisadas, F1 5Gy HT-29 e F1 5Gy Caco-2 quando comparadas com suas respectivas F1 controles.

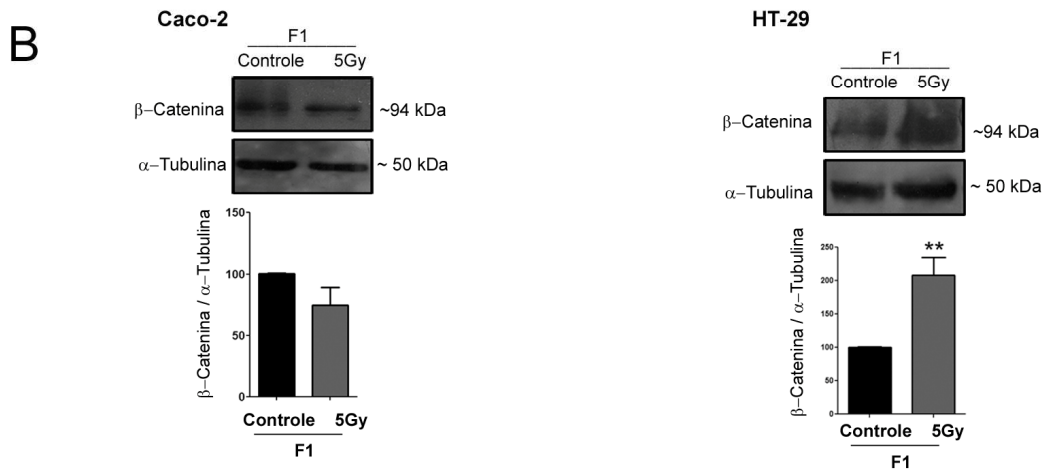
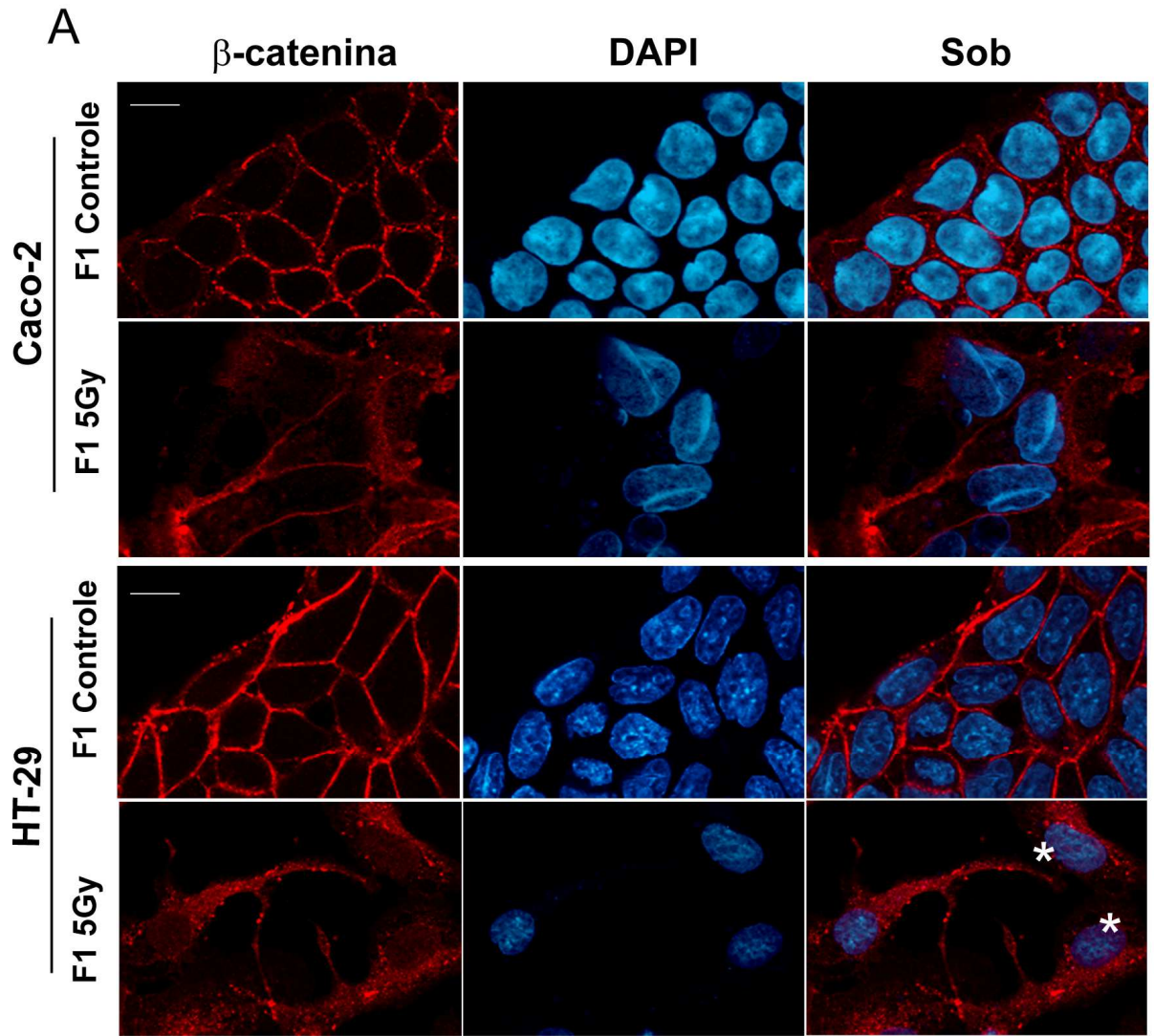
Figura 13: Efeitos da radiação sobre a localização subcelular e expressão da proteína de adesão E-caderina nas progênies derivadas de células sobreviventes. **A:** F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 foram cultivadas em lamínulas até a formação de colônias e submetidas a técnica de imunofluorescência. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. O núcleo foi marcado com DAPI. Seta: E-caderina internalizada; Cabeça de seta: Aglomerados citoplasmáticos de E-caderina; Barra: 10 μm **B:** Análise da expressão de E-caderina nas F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem de expressão da proteína nos lisados de F1 5Gy em relação aos lisados da F1 Controle (F1Controle = 100 %). A α - tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.



4.5 As progênies de células irradiadas apresentam alterações tanto na expressão quanto na localização subcelular de β -catenina.

Uma vez que alterações de expressão e localização da E-caderina podem promover o aumento do *pool* citoplasmático de β -catenina, e tal evento pode contribuir em diversas vias relacionadas à progressão tumoral, analisou-se a localização subcelular e os níveis de expressão proteica dessa proteína. Na Fig. 14 A é possível observar uma marcação bem definida da β -catenina nos contatos celulares das F1 Controle de Caco-2 e HT-29. No entanto, as colônias de ambas as progênies derivadas de células irradiadas (F1 5Gy) mostram uma redistribuição intensa desta proteína dos contatos celulares para o citoplasma, incluindo localização nuclear evidente nas células da F1 5Gy de HT-29 (Fig. 14A). Além da localização subcelular, foi avaliada também os níveis de expressão de β -catenina por *immunoblotting* e a análise densitométrica revelou uma ligeira redução desta proteína nas F1 5Gy de Caco-2 e um aumento significativo da sua expressão nas F1 5Gy de HT-29 quando comparadas às suas respectivas F1 Controle (Fig. 14B). Juntos, estes resultados demonstraram que a radiação induz alterações na localização subcelular e expressão de β -catenina nas progênies derivadas de células sobreviventes ao tratamento.

Figura 14. Efeitos da radiação sobre a localização subcelular e expressão de β -catenina nas progênies derivadas de células sobreviventes. A: F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 foram cultivadas em lamínulas até a formação de colônias e submetidas a técnica de imunofluorescência. As imagens são representativas de pelo menos três experimentos independentes. O núcleo foi marcado com DAPI. Asterisco: localização nuclear de β -catenina. Barra: 5 μ m. B: *Immunoblotting* de β -catenina nas F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem de expressão da proteína nos lisados de F1 5Gy em relação aos lisados da F1 Controle (F1Controle = 100 %). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando ** $p < 0,01$



4.6 O tratamento com a radiação induz um aumento da expressão e intensa reorganização do filamento intermediário vimentina na progênie derivada de células HT-29 irradiadas.

Uma vez observada a desorganização dos contatos celulares e redução da expressão de E-caderina, o que pode ser sugestivo de EMT, analisou-se a expressão e localização da vimentina, um filamento intermediário considerado um marcador de EMT que possui sua expressão aumentada em células metastáticas (SABBAH et al., 2008; WEI et al., 2008). Foi observado um aumento do nível de expressão de vimentina somente na F1 5Gy HT-29, enquanto ambas as progênies F1 Controle e F1 5Gy Caco-2 não apresentam níveis detectáveis desta proteína (Fig. 15A). Sendo assim, foi realizada a imunofluorescência somente nas F1 HT-29 para análise da localização subcelular de vimentina. Observou-se por imunofluorescência uma intensa redistribuição desses filamentos, acompanhando os prolongamentos celulares induzidos na F1 5Gy HT-29 (Fig. 15B). Esses resultados mostram que somente a progênie que adquiriu um fenótipo fibroblástico teve aumento nos níveis de expressão de vimentina, bem como sua redistribuição para os prolongamentos celulares.

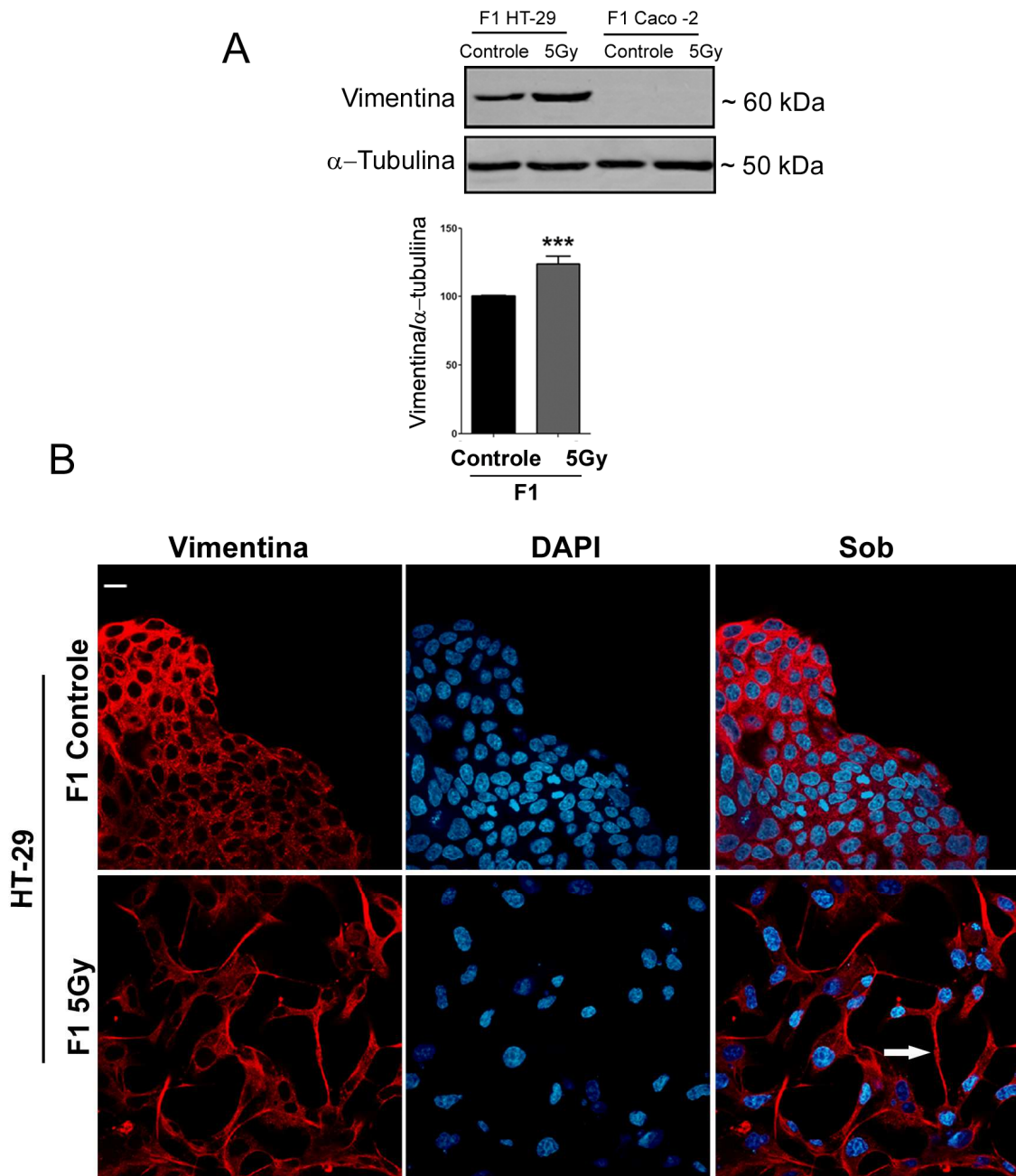


Figura 15. Expressão e localização subcelular de Vimentina na progênie derivada de células HT-29 irradiadas. **A:** análise por imunoblotting dos níveis de proteína vimentina em lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 . Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem de expressão da proteína nos lisados de F1 5Gy em relação aos lisados da F1 Controle (F1Controle = 100 %). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando *** $p < 0,001$. **B:** F1 Controle e F1 5Gy de HT-29 foram cultivadas em lamínulas de vidro até a formação de colônias e submetidas à imunofluorescência para avaliar a localização de vimentina. O núcleo foi marcado com DAPI. Imagens representativas de pelo menos três experimentos independentes. Seta: localização de vimentina nas protrusões celulares. Barra: 10 μ m.

4.7 A progênie de células irradiadas apresentam intensa reorganização do citoesqueleto.

É bem estabelecido que a organização do citoesqueleto de actina modula a perda de contatos célula-célula e a aquisição de um fenótipo migratório em células epiteliais que estão sob o processo de progressão maligna, induzindo a formação de protrusões de membrana como lamelipódios, filopódios e invadopódios, os quais são essenciais para a migração e invasão celular (HAYOT et al., 2006; YAMAGUCHI ; CONDEELIS, 2007; KELLEY et al., 2008). Uma vez que resultados prévios mostraram alterações relacionadas à progressão tumoral nas progênies derivadas de células irradiadas, como alterações na distribuição e expressão de proteínas de adesão e vimentina, analisou-se o perfil de organização do citoesqueleto de actina nessas progênies. Através da análise por microscopia confocal de fluorescência direta utilizando-se faloidina conjugada a rodamina isotiocianato, observou-se que ambas as progênies F1 5Gy Caco-2 e F1 5Gy HT-29 apresentaram uma intensa reorganização do citoesqueleto (Fig. 16). Embora a F1 5Gy Caco-2 ainda tenha mantido um perfil epitelial, com adesão às células vizinhas (embora aberrante), foi possível observar a formação de projeções de membrana do tipo lamelipódio nas bordas das colônias, com uma região bem definida de filamentos de actina e estruturas semelhantes à *ruffles* de membrana. Já a F1 5Gy HT-29, a qual as células adotaram um formato mesenquimal e alongado, mostram uma evidente dispersão celular, onde as células individuais apresentam uma formação de lamelipódios restrita na região do *front* e uma longa retração da cauda (região posterior da célula), características de células altamente migratórias (PETRIE et al., 2009). Estes resultados indicam que as progênies derivadas de ambas as células irradiadas, Caco-2 e HT-29 adquirem uma reorganização diferencial do citoesqueleto que são relacionadas com um perfil mais migratório, quando comparadas às suas respectivas progênies derivadas de células não irradiadas.

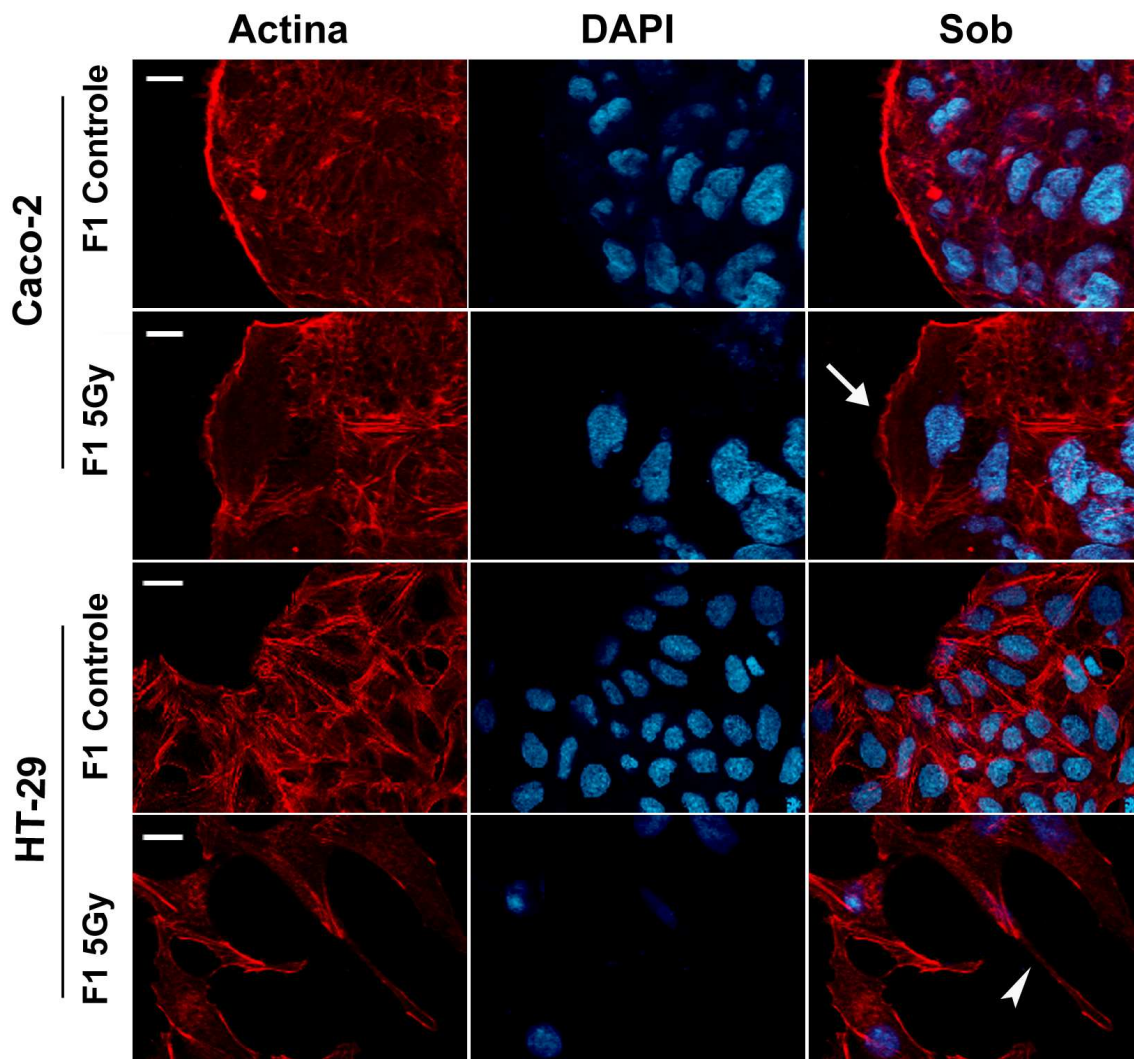


Figura 16. Análise do citoesqueleto de actina nas progênies derivadas de células irradiadas Caco-2 e HT-29. F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 foram cultivadas em lamínulas até a formação de colônias, fixadas e marcadas para F-actina. Imagens de microscopia confocal mostram a redistribuição do citoesqueleto bem como a formação de protrusões de membrana. O núcleo foi marcado com DAPI. Imagens representativas de pelo menos três experimentos independentes. *Seta*: Lamelipódio. *Cabeça de seta*: retração da cauda. Barra: 10 μ m.

4.8 Progênies derivadas de células HT-29 irradiadas, mas não de Caco-2 apresentam um aumento do potencial migratório.

É bem estabelecido que um aumento da migração e invasividade celular são características de malignidade em células epiteliais. A migração celular é dirigida por estruturas protrusivas e contratilidade dos filamentos de actina, sendo a organização e direcionamento do citoesqueleto responsável pela geração de forças para as protrusões de membrana

(TOJKANDER et al., 2011). Neste contexto, com intuito de avaliar o quanto a reorganização do citoesqueleto observadas nas progênes derivadas das células Caco-2 e HT-29 irradiadas poderiam promover um aumento da migração celular, foi realizado o ensaio de *wound healing*. Curiosamente, observa-se uma redução da migração das progênes F1 5Gy Caco-2 e um aumento do potencial migratório das progênes F1 5Gy HT-29 (Fig.16A e Fig.16B, respectivamente). Dessa forma, os resultados sugerem que embora a progênie F1 5Gy caco-2 apresente uma desorganização dos complexos de adesão (Fig.13 e Fig.14) e a formação de estruturas relacionadas a migração celular, somente as Progênes derivadas de células HT-29 irradiadas que aumentaram sua capacidade migratória, sugerindo uma correlação entre a aquisição de um fenótipo fibroblástico, intensa dispersão celular e o tipo de protrusão de membrana formada com o aumento da migração celular observada na Fig. 16.

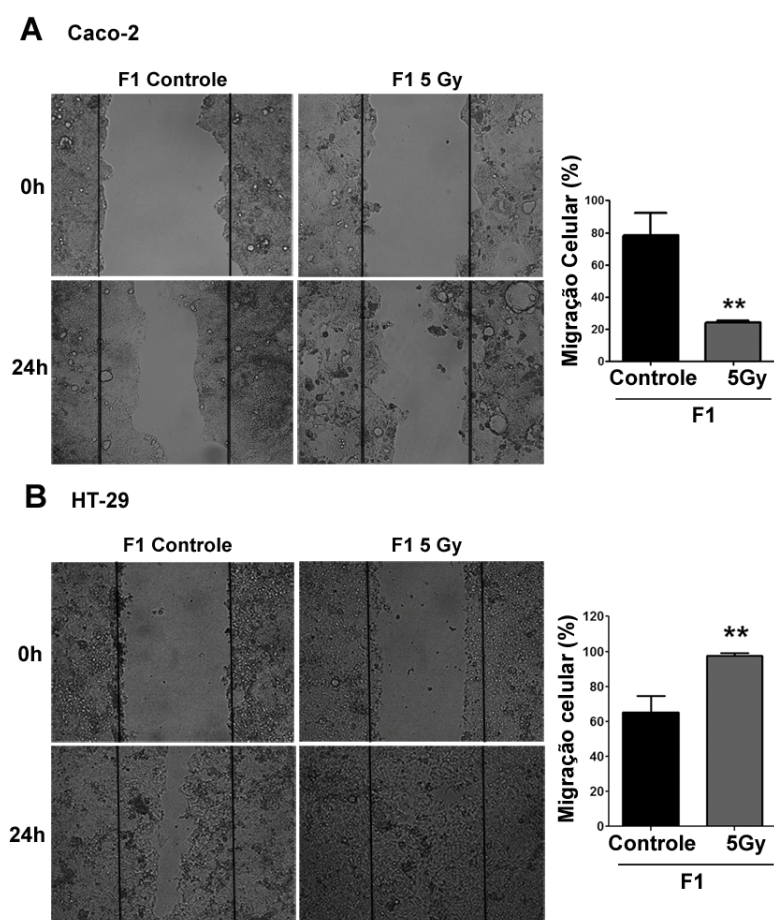


Figura 17. Análise do potencial migratório e invasivo de progênes derivadas de células irradiadas. F1 Controle e F1 5Gy Caco-2 (A) e F1 Controle e F1 5Gy HT-29 (B) foram cultivadas até a confluência e submetidas ao ensaio de *wound healing*. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem de migração celular da F1 5Gy em relação à migração da F1 Controle (Fechamento total do espaço entre as duas bordas = migração 100 %) e representativos da media \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes.

4.9 A progênie com fenótipo mais migratório, F1 5Gy HT-29, apresenta um aumento do seu potencial invasivo e da atividade metaloprotease.

Na sequência, foi analisada a capacidade invasiva de ambas as progênies derivadas de Caco-2 e HT-29. Foi possível observar que as progênies F1 Controle e F1 5Gy Caco-2 não são capazes de invadir o matrigel, enquanto que a F1 5Gy HT-29 apresenta um aumento da invasividade quando comparadas com a progênie F1 Controle HT-29 (Fig. 18A). Uma vez que a invasividade está relacionada à degradação de matriz extracelular e que em CCR ocorre um aumento das MMPs -2 e -9, avaliou-se atividade metaloprotease dessas progênies mais invasivas pelo ensaio de zimografia. Através desse ensaio, foi observado um aumento da atividade de MMPs -2 nas F1 5Gy HT-29 quando comparadas com sua respectiva progênie controle, F1 Controle HT-29 (Fig. 18 B). Juntos esses resultados mostram que a progênie derivada de células HT-29 irradiadas além de apresentarem um aumento da migração celular (Fig.17), também apresentaram alta capacidade invasiva e aumento da atividade metaloprotease.

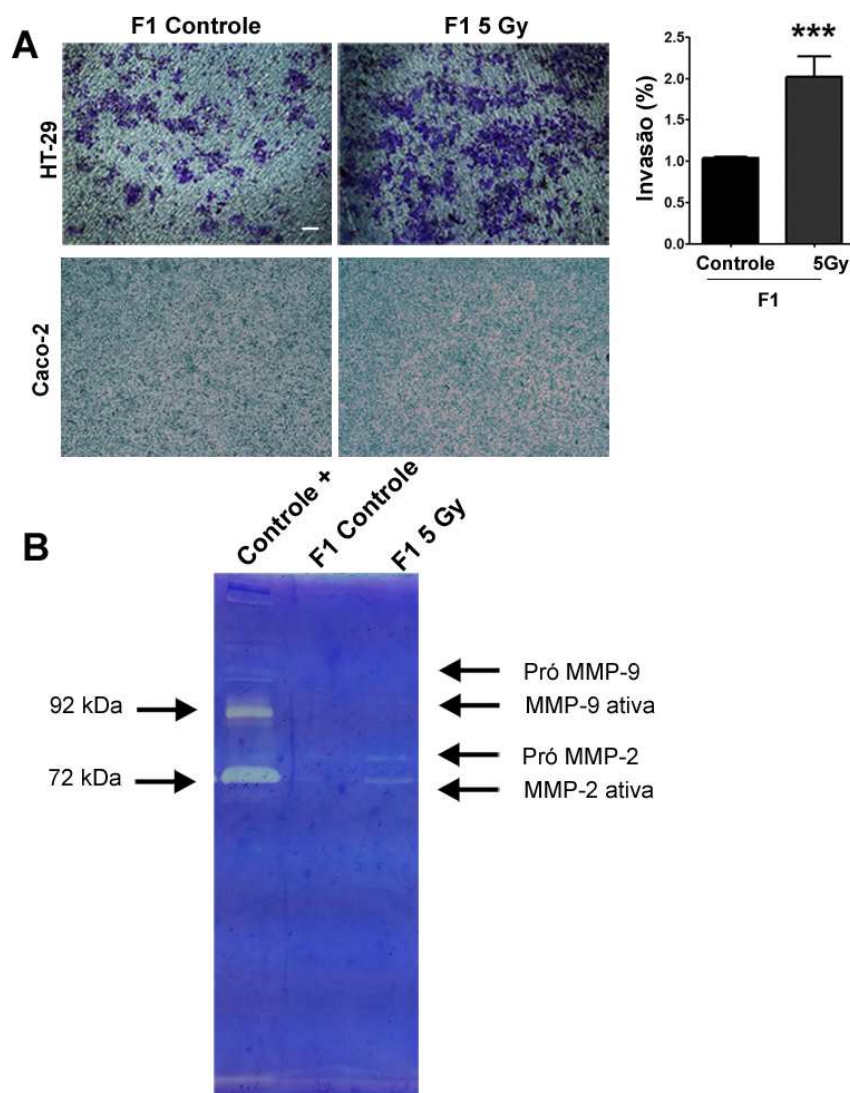


Figura 18. Análise do potencial invasivo e de atividade metaloproteinase de progênies derivadas de células irradiadas. **A:** células da F1 Controle e F1 5Gy de Caco-2 e HT-29 foram cultivadas em insertos Transwell® cobertos com Matrigel® e submetidas ao ensaio de invasão. Os gráficos representam os dados normalizados como o número de vezes que invasão aumentou na F1 5Gy em relação a F1 Controle (F1 Controle = 1). Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. **B:** Meios de cultura condicionados derivados de F1 Controle e F1 5Gy HT-29 foram submetidos ao ensaio de zimografia. Imagem representativa de 2 experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando ** $P < 0,01$ e *** $p < 0.001$.

4.10 Progênie derivada de células HT-29 irradiadas apresenta tanto um aumento na fosforilação de GSK-3 β quanto um aumento da atividade transcricional de *TCF-LEF*.

Resultados prévios mostraram tanto um aumento da expressão quanto uma marcação nuclear de β -catenina na F1 5Gy HT-29 (Fig. 14A Fig.14B). A localização nuclear da β -catenina é relacionada com a ativação da via Wnt canônica, na qual a *glycogen synthase-3 β* (GSK-3 β) atua na manutenção do *pool* citoplasmático de β -catenina (FRAME ; COHEN, 2001). A atividade de GSK-3 β é regulada por fosforilação e está inibida quando fosforilada no resíduo de serina 9 (Ser-9), prevenindo assim a degradação de β -catenina, aumentando seus níveis citoplasmáticos e favorecendo sua translocação nuclear. No núcleo, essa proteína liga-se à região promotora de *TCF/LEF* e aumenta a atividade transcricional de genes que regulam diversos processos como sobrevivência, migração e invasão (LUO, 2009). Sendo assim, com o intuito de analisar o envolvimento desta via como consequência da localização nuclear de β -catenina observada na F1 5Gy HT-29, inicialmente avaliou-se a fosforilação de GSK-3 β por *immunoblotting* usando um anticoro que reconhece a forma inativa da GSK-3 β (fosforilada na Ser-9). Como observado na Fig. 19A, houve um aumento nos níveis de p-GSK3- β nas células da F1 5Gy HT-29 quando comparadas com as células da F1 Controle HT-29. Em seguida, com intuito de avaliar se a redução da atividade de GSK3- β estaria relacionada com a atividade transcricional de β -catenina, foi realizado o ensaio de luciferase e observou-se um aumento da atividade promotora de *TCF/LEF* na F1 5Gy HT-29 de aproximadamente 7 vezes em comparação com a F1 Controle HT-29 (Fig. 19B). Juntos estes resultados indicam que o aumento do *pool* citoplasmático de β -catenina observado na F1 5Gy HT-29 (Fig. 14A) pode estar relacionado a uma maior translocação de β -catenina para o núcleo, onde esta proteína pode induzir a atividade transcricional de genes relacionados com a via WNT canônica. Além disso, esses eventos foram dependentes da atividade de GSK-3 β .

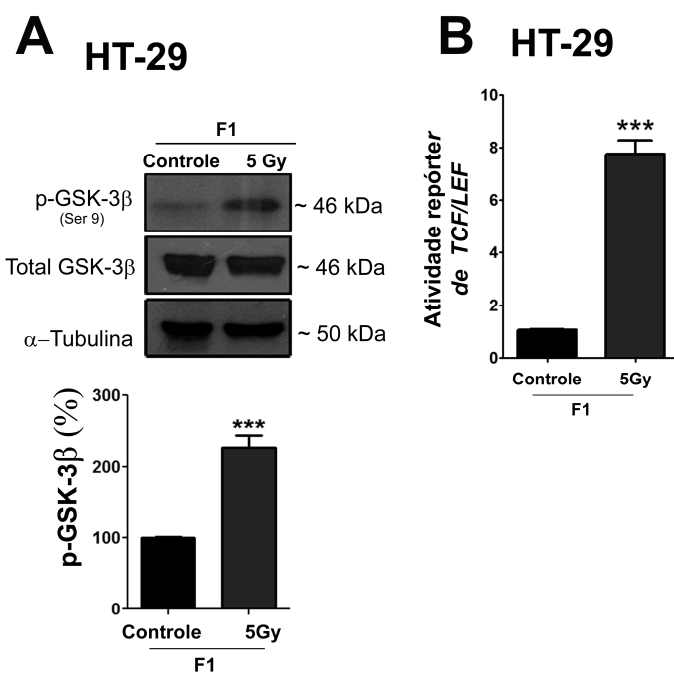


Figura 19: Perfil de fosforilação de GSK-3β e atividade de TCF-LEF na progênie derivada de células HT-29 irradiadas. **A:** Análises por imunoblotting da fosforilação (Ser-9) e níveis totais de GSK-3β nas F1 Controle e F1 5Gy HT-29. Os gráficos representam os dados normalizados como porcentagem de expressão da proteína nos lisados de F1 5Gy em relação aos lisados da F1 Controle (F1 Controle = 100 %). A α -tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão proteica. Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. **B:** F1 Controle e F1 5Gy HT-29 foram submetidas ao ensaio de Luciferase Repórter para avaliar a atividade transcricional de TCF/LEF. Os gráficos representam os dados normalizados como o aumento da atividade de TCF/LEF da F1 5Gy em relação a F1 Controle (F1 Controle = 1). Dados representativos da média \pm SEM de três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando *** $P < 0,001$.

4.11. Progênie derivada de células HT-29 irradiadas apresenta um aumento na expressão de marcadores mesenquimais e redução da expressão de E-caderina.

O aumento do potencial migratório e invasivo de células epiteliais pode ser correlacionado com o desenvolvimento de EMT, onde marcadores epiteliais apresentam sua expressão diminuída e marcadores mesenquimais aumentados. Com intuito de analisar se o aumento das características malignas observadas nas células F1 5Gy HT-29 poderia estar relacionada com o processo de EMT, analisou-se a expressão de genes relacionados com o fenótipo mesenquimal (genes que codificam Snail, Slug, Twist, Vimentina, Fibronectina, e N-caderina) e a expressão do gene marcador epitelial E-caderina através do qRT-PCR. A Fig. 20 mostra uma significativa redução dos níveis de RNAm de E-caderina, seguida por um

aumento dos níveis de RNAm de Snail, Slug e Fibronectina. Os níveis do RNAm de Twist e N-caderina também foram aumentados, porém sem significância estatística, enquanto que o nível do RNAm de vimentina não foi alterado. Esses resultados indicam que a progênie mais invasiva derivada de células irradiadas, HT-29, apresenta um perfil de expressão gênica relacionado ao desenvolvimento de um fenótipo EMT-like.

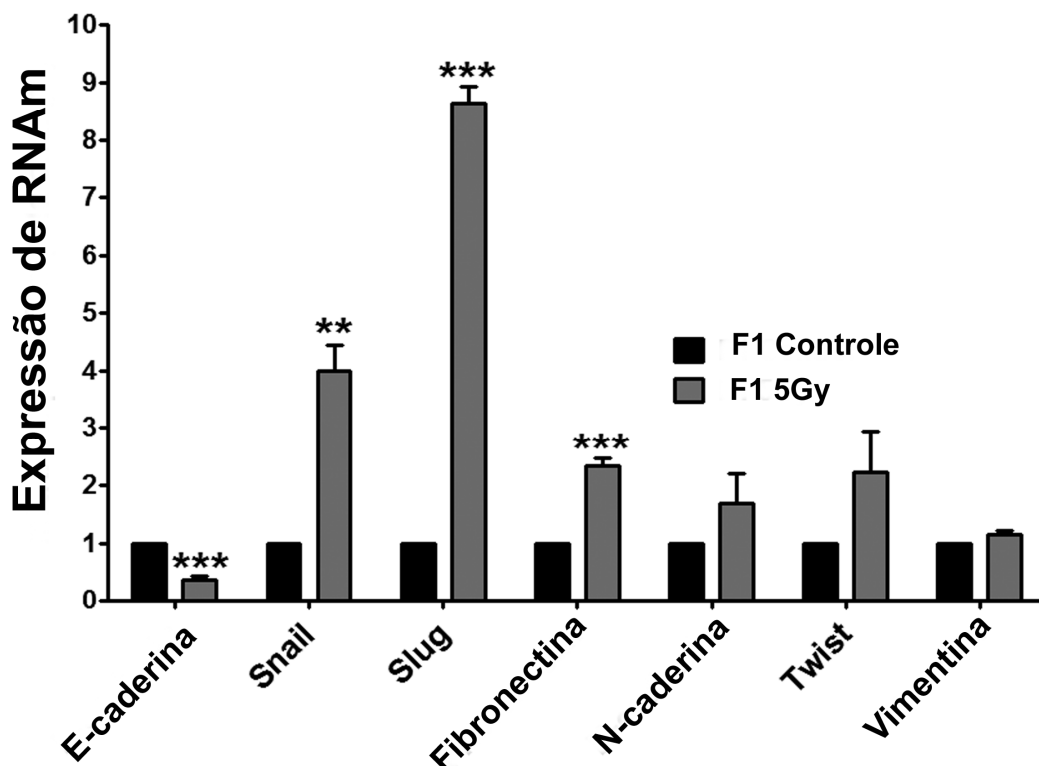


Figura 20. Perfil de expressão gênica relacionado à aquisição de um fenótipo mesenquimal na progênie derivada de células HT-29 irradiadas. Análise por qRT-PCR da expressão de genes relacionados ao fenótipo mesenquimal (genes que codificam Snail, Slug, Twist, Vimentina, Fibronectina, e N-caderina) e do gene de E-caderina, um marcador epitelial. Os gráficos representam os dados normalizados como o alterações na expressão dos RNAm da F1 5Gy em relação a expressão dos RNAm da F1 Controle (F1 Controle = 1). Dados representativos da média \pm SEM de ensaios em triplicata para cada linhagem celular em três experimentos independentes. Análise estatística realizada pelo teste-*t* de Student e a diferença foi considerada significativa quando ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.12. Análise global do perfil de glicosilação de produtos de GNT-V (N-glicanos ramificados do tipo β 1,6) na progênie mais invasiva F1 5Gy HT-29

Estudos recentes mostraram a influência de alterações na expressão de *N*-glicanos tanto na aquisição de um caráter migratório e invasivo quanto na modulação da resposta terapêutica à inibidores tirosina quinase a radiação (YAMAMOTO et al., 2000; DOTE et al., 2005; CONTESSA et al., 2008;). Porém, o perfil de modificações pós-traducionais relacionadas à glicosilação adquiridas por células que sobrevivem à radioterapia não é conhecido. Sendo assim, com intuito de caracterizar sobre outro aspecto, o fenótipo dessas células que adquirem uma maior capacidade migratória e invasiva após a radiação, foi avaliado o perfil global de expressão de *N*-glicanos nessas progênies. Inicialmente, utilizou-se lectinas do tipo L-PHA, as quais reconhecem *N*-glicanos complexos ramificados, que são produtos da enzima GnT-V. A Fig. 21 mostra que houve um aumento global da expressão de *N*-glicanos complexos ramificados nas progênies derivadas de células HT-29 sobreviventes à radioterapia, quando comparadas com a progênie controle.

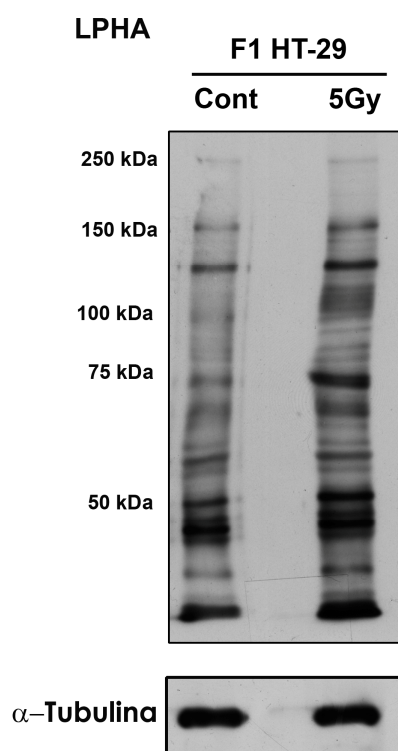


Figura 21: Análise do perfil global de *N*-glicanos complexos em lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de HT- 29. Lisados totais obtidos de F1 Controle e F1 5Gy de HT- 29 foram analisados por *blotting* de lectinas utilizando L-PHA. A α - tubulina foi utilizada como controle endógeno de expressão protéica. Dados representativos da de três experimentos independentes.

4.13 Análise do perfil de distribuição de proteínas em gel bidimensional e seu perfil de N-glicosilação na progênie F1 Controle e F1 5Gy de HT-29.

Com intuito de obter uma melhor resolução no que diz respeito ao perfil de glicosilação proteica do tipo N-ligada, os lisados celulares obtidos das F1 Controle e F1 5Gy HT-29 foram submetidos a eletroforese 2D, onde a separação proteica é realizada tanto por peso molecular quanto por seu ponto isoelétrico. Uma vez que trabalhos anteriores sugerem que o aumento da atividade de GnT-V é correlacionado com um aumento da capacidade invasiva e migratória das células tumorais; bem como com a desestabilização dos contatos celulares (PINHO et al., 2013b); e além do fato de termos observado uma redução de expressão de E-caderina em NA F1 5Gy HT-29 (Fig.13A), um par de géis bidimensionais (F1 Controle e F1 5Gy) foi submetido à coloração por *Comassie Blue*, a fim de visualizar a diferença de expressão protéica entre as condições experimentais; e o outro par foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e submetido ao *blotting* para L-PHA, bem como para o *immunoblotting* para E-caderina, com intuito de avaliar se a glicosilação poderia estar correlacionada com a redução de expressão da E-caderina nas F1 5Gy HT-29. A Fig. 22 mostra um perfil de expressão protéica diferenciado entre as duas progênies analisadas, evidenciado pela presença de diversos *spots* onde há diferença de expressão. Porém, nos géis corados com *Comassie blue*, observou-se uma redução de expressão de proteínas próximas ao peso molecular da E-caderina (aproximadamente 120 kDa, indicado pela seta rosa no par superior desta figura) nas progênies derivadas de HT-29 irradiadas, quando comparadas às progênies derivadas de HT-29 controles. O par de membranas correspondente aos géis bidimensionais direcionados à marcação com L-PHA mostraram um aumento da glicosilação global na F1 5Gy HT-29 em diversas proteínas, corroborando o resultado obtido no *blotting* do gel 1D da Fig. 21. Porém, observa-se um aumento sutil do perfil de N-glicosilação na F1 5Gy HT-29 na faixa de peso molecular também próximo à E-caderina, como indicado pela seta em amarelo. Com intuito de confirmar se as alterações encontradas tanto nos níveis de expressão total de proteínas quanto àquelas relacionadas à glicosilação, seriam coincidentes com a E-caderina, as mesmas membranas previamente marcadas com L-PHA foram submetidas ao *immunoblotting* para E-caderina. Como podemos observar, as membranas provenientes dos géis 2D mostram um rastro de E-caderina (seta azul) na mesma localização das alterações anteriores observadas (entre 100 e 150 kDa), mostrando que a E-caderina além de ter sua expressão reduzida na F1 HT-29 5Gy (o que corrobora um resultado já apresentado, Fig. 13B) sugerem sofrer modificações da glicosilação, como mostrado no *blotting* para L-PHA. Juntos esses resultados

sugerem que a progênie derivada de células HT-29 irradiadas apresentam um aumento global da expressão de N-glicanos complexos que é concomitante à redução dos níveis de expressão protéica da E-caderina.

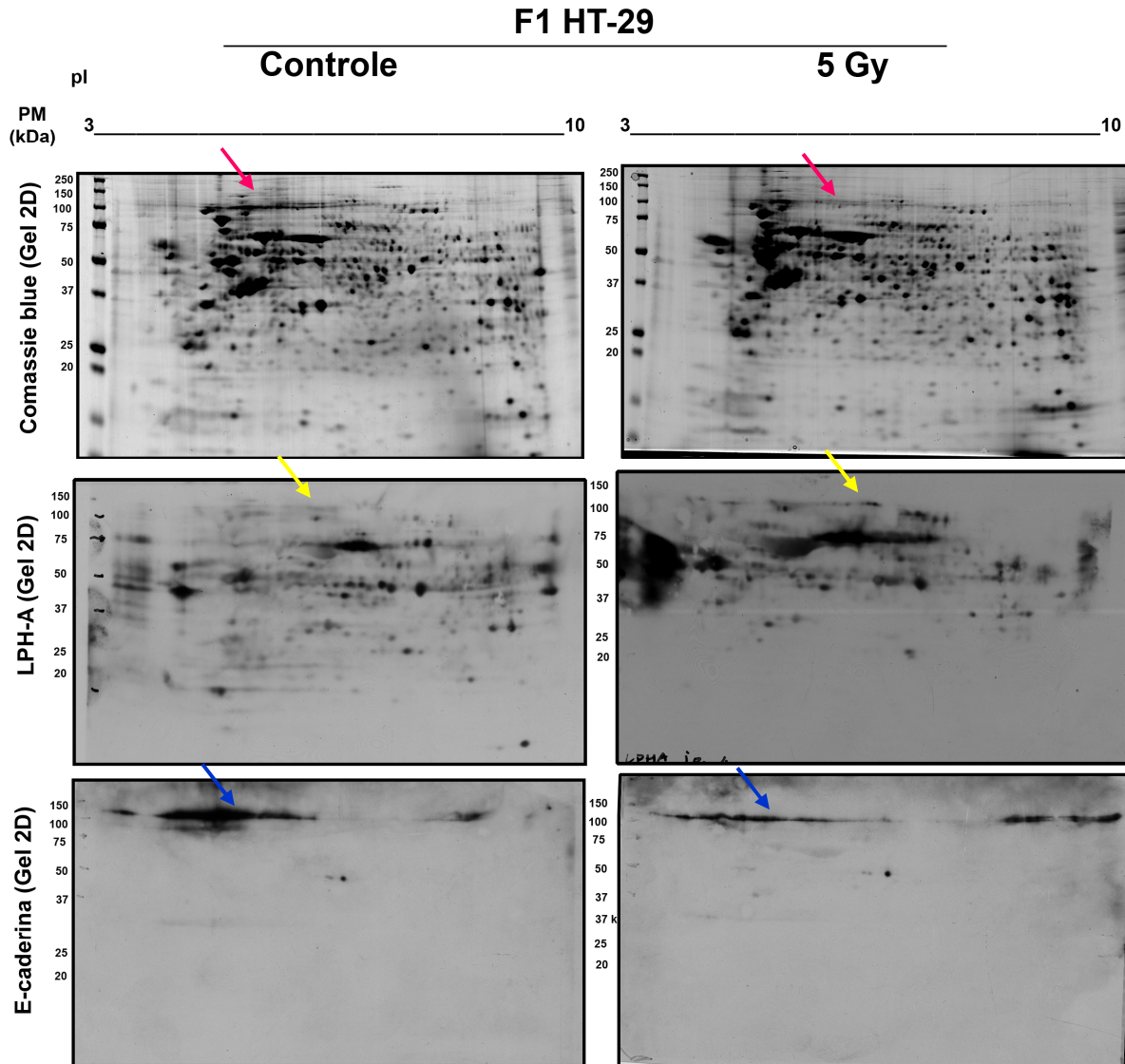


Figura 22: Eletroforese 2D e análise por blotting para L-PHA e western blot para E-caderina. Lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de HT-29 foram submetidos à eletroforese 2D em 2 pares, sendo um par direcionado à coloração por Comassie blue (superior) e outro par submetido ao blotting para LPH-A (meio) e E-caderina (inferior). Dados representativos de dois experimentos independentes. Seta rosa: Rastro proteico entre 100 e 120 kDa; Seta amarela: Glicosilação N-ligada. Seta azul: Immunoblotting para E-caderina.

4.14 Células da F1 5Gy HT-29 apresentam moléculas de E-caderina hiperglicosiladas

Com intuito de validar o aumento da expressão de *N*-glicanos observado na faixa de peso molecular próxima à da molécula de E-caderina, foi realizado um ensaio de imunoprecipitação seguido por *western blot* para E-caderina e *blotting* para L-PHA. Na Fig. 23 observa-se mais uma vez a confirmação da redução da expressão de E-caderina na F1 5Gy-HT-29 em seus níveis protéicos, no entanto, o perfil de glicosilação é equivalente ao perfil de glicosilação da F1 Controle HT-29, sugerindo que as moléculas de E-caderina remanescentes na progênie F1-5Gy HT-29 estejam hiperglicosiladas.

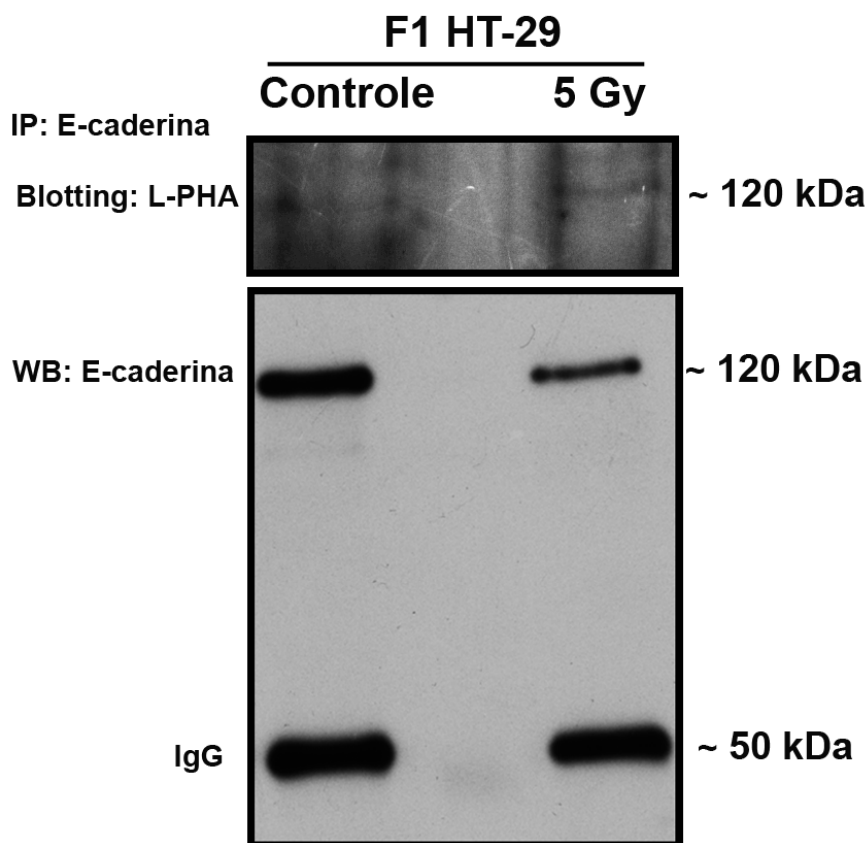


Figura 23: Imunoprecipitação de E-caderina e análise por *blotting* para L-PHA e *western blot* para E-caderina. Lisados celulares de F1 Controle e F1 5Gy de HT-29 foram submetidos à eletroforese e submetidas à imunoprecipitação com *beads* de agarose impregnadas com anticorpo anti-Ecaderina. Em seguida, o lisado purificado foi submetido ao *blotting* de lectinas para L-PHA e *western blot* pra E-caderina total. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.15 As células da F1 5Gy HT-29 que apresentam intensa marcação para as lectinas L-PHA mostram redução da marcação para E-caderina.

Com intuito de visualizar a localização subcelular dos *N*-glicanos e da E-caderina, células F1 Controle e F1 5Gy HT-29 foram submetidas à técnica de imunofluorescência. A Fig. 24 mostra um aumento da marcação das lectinas L-PHA na F1 5Gy HT-29 em relação à sua progênie controle. É possível observar também que, células com intensa marcação para L-PHA apresentam um perfil de marcação reduzida para E-caderina, sugerindo a participação *N*-glicanos complexos ramificados no processo de degradação da E-caderina.

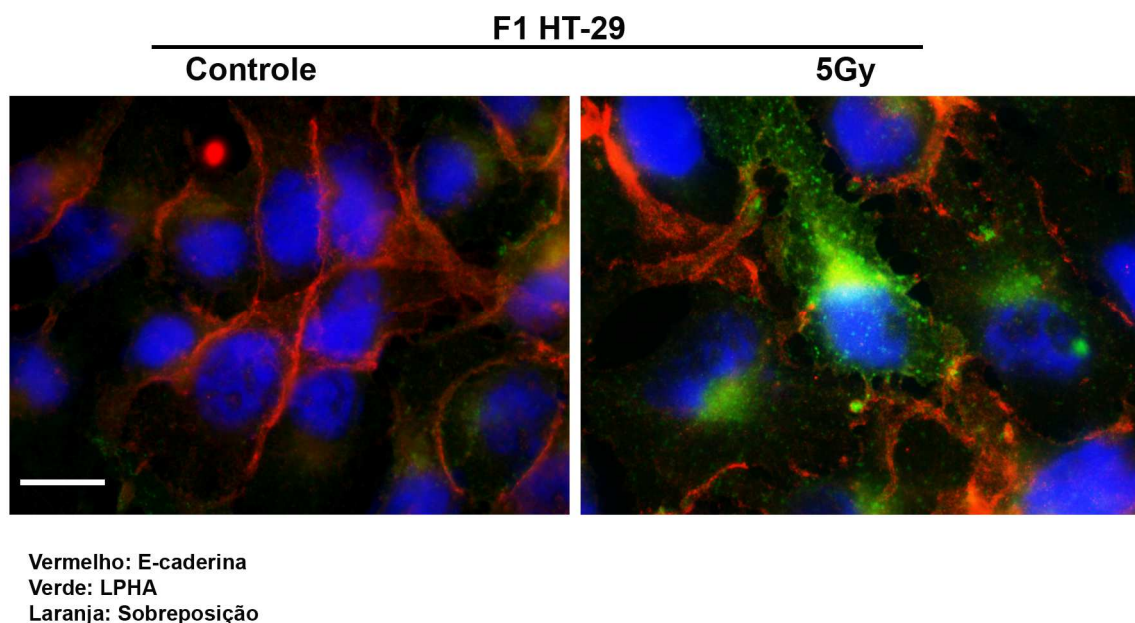


Figura 24: Imunofluorescência para E-caderina e Fluorescência para L-PHA. Células F1 Controle e F1 5Gy HT-29 foram cultivadas em lamínulas e submetidas à fixação para marcação com E-caderina (vermelho), L-PHA (verde) e DAPI (azul) para marcação do núcleo. Dados representativos experimento único.

5. DISCUSSÃO

As estratégias terapêuticas do CCR envolvem a quimioterapia, radioterapia (RT) e cirurgia para pacientes em estadiamento avançado da doença (GLYNNE-JONES, 2012; PRAMATEFTAKIS ET AL., 2012). Embora estudos tenham mostrado que a RT pré-operatória reduz a recorrência local do CCR, não há estudos que mostrem impacto na sobrevida desses pacientes e a taxa de mortalidade ainda permanece alta, em torno de 40 a 70% (KAPITEIJN et al., 2001; SAUER et al., 2004; SEBAG-MONTEFIORE et al., 2009). Além disso, pacientes que foram submetidos à RT neo-adjuvante e que mesmo assim desenvolveram recorrência local, apresentavam uma sobrevida mais curta e metástases simultâneas quando comparados com pacientes que não receberam RT para o tratamento do tumor primário (VAN DEN BRINK et al., 2004). A toxicidade da RT constitui-se um fator limitante da dose a ser administrada, sendo um dos motivos pelos quais o tratamento deve ser baseado no multifracionamento de doses. Porém, esse esquema de administração de doses sub-letais produz uma janela terapêutica que permite a interação das células remanescentes ao tratamento com o microambiente irradiado. Sabe-se que a morte celular induzida pela radiação não é um processo imediato, e a radiação induz a secreção de citocinas e fatores de crescimento que atuam de maneira autócrina e parácrina em nível celular e tecidual, sendo a radiosensibilidade do tumor uma questão muito importante do ponto de vista do sucesso terapêutico. Dessa forma, células sobreviventes em contato com este microambiente induzido pela radiação podem sofrer influências em suas características proliferativas (promovendo a repopulação do tumor) ou até mesmo na capacidade migratória e invasiva (favorecendo o processo metastático das células tumorais sobreviventes) (KIM ; TANNOCK, 2005). Alguns estudos têm mostrado os efeitos da radiação em células diretamente atingidas e em períodos curtos após o tratamento (SOMOSY, 2000; ANDARAWEWA et al., 2007; de CARVALHO et al., 2006;) e poucos têm focado na questão das células que sobrevivem a esse tratamento (LIU et al., 2005; BUONANNO et al., 2011). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nesses processos assim como eventos que levam ao desenvolvimento da radiorresistência em CCR, ainda não são conhecidos.

No presente estudo, as progênies derivadas de células de CCR sobreviventes à RT foram analisadas fenotípicamente em relação às características relacionadas à progressão maligna do tumor. Inicialmente, analisou-se a radiosensibilidade das células de CCR (Fig.10 A) e observou-se que a linhagem celular mais diferenciada, Caco-2 e a linhagem celular com

diferenciação moderada, HT-29, foram mais radiorresistentes do que as células indiferenciadas, HCT-116 (FLATMARK et al., 2004). É possível que a radiosensibilidade diferencial observada nas linhagens utilizadas possa ser explicada, pelo menos em parte, pelo fato destas células apresentarem diferentes *status* mutacionais. Estima-se que o gene *TP53* esteja mutado em 40–50% dos CRCs (LÓPEZ et al., 2012), sendo assim importante analisar a resposta ao tratamento em células com diferentes perfis de expressão de p53. *TP53* é *wild type* nas células HCT-116 e mutado nas células Caco-2 (sendo a proteína p53 indetectável) o que impede a indução de caspase nessas células (LIU ; BODMER, 2006). O gene *TP53* é mutado também na linhagem HT-29, porém, este tipo de mutação induz a superexpressão de uma proteína p53 não funcional e com um aumento da sua meia vida (COTTU et al., 1996), o que poderia resultar na indução intermediária de caspase, como observado na Fig. 10 B. Dessa forma, o status de *TP53* nessas células poderia explicar a indução diferencial de caspase observada após o tratamento com a radiação.

Uma vez que a radiosensibilidade foi diferente entre as linhagens celulares, também foi analisada a expressão da proteína survivina, a qual constitui um membro da família de inibidoras de apoptose (IAP) que se encontra aumentada na maioria dos tumores humanos, porém é indetectável na maioria das células diferenciadas (JOHNSON ; HOWERTH, 2004; MITA et al., 2008). Os resultados mostraram um aumento da sua expressão nas progênes derivadas das células mais resistentes e com baixa atividade de caspase, F1 5Gy Caco-2 e F1 5Gy HT-29 e uma drástica redução da expressão de survivina nas progênes derivadas das células mais radiosensíveis e com alto índice de ativação de caspase, F1 5Gy HCT-116. Estudos mostram que a alta expressão de survivina nos tumores está relacionada a um pior prognóstico dos pacientes e a falha no tratamento (RÖDEL et al., 2002; STAUBER et al., 2007; RÖDEL et al., 2011). Além disso, a superexpressão de survivina está envolvida na inibição da apoptose, seja por via direta ou indireta, e alterações nessa via de morte celular podem afetar negativamente a resposta das células tumorais à terapia (DEVERAUX ; REED, 1999). Ainda, em alguns estudos foi demonstrado que o aumento da sua expressão induz resistência à vários agentes quimioterápicos, como cisplatina, bortezomib e tamoxifen (MORIAI et al., 2009; ZHANG et al., 2006). Sendo assim, os resultados sugerem que a expressão de survivina pode indicar uma via importante na manutenção das células sobreviventes após a radioterapia.

Em paralelo a resistência à morte celular, tanto a desorganização dos sistemas de adesão intercelulares quanto alterações na expressão de seus componentes, como a E-caderina

e a β -catenina estão relacionadas à progressão do câncer e metástase (JAMORA ; FUCHS, 2002; GIEPMANS ; VAN IJZENDOORN, 2009). Neste estudo, os resultados mostraram intensa anormalidade na morfologia das colônias de progênies provenientes das células mais radorresistentes, F1 5Gy Caco-2 e F1 5Gy HT-29 (Fig.12), a qual foi intimamente relacionada à alterações tanto da localização subcelular quanto da expressão de E-caderina e β -catenina (Fig. 13 e 14). Na F1 5Gy Caco-2 foi possível observar uma marcação descontínua de E-caderina e internalização aparentemente em vesículas sugestivas de endocitose. Embora a via endocítica possa direcionar tanto para a reciclagem quanto para a degradação (BRYANT; STOW, 2004; PALACIOS et al., 2005) a redução da expressão de E-caderina observada no *immunoblotting* sugere que esteja seguindo a via de degradação lisossomal. Em relação à β -catenina, embora não tenha sido observada uma alteração significativa da sua expressão na F1 5Gy Caco-2, foi possível observar um perfil de marcação difusa no citoplasma, embora as colônias da F1 5Gy Caco-2 ainda mantivessem sua característica coesa entre as células. Um efeito mais proeminente de desorganização da adesão celular pode ser observado na F1 5Gy HT-29, na qual a imunofluorescência mostra uma intensa desorganização da adesão celular e a formação de agregados citoplasmáticos de E-caderina, concomitante com uma redução da sua expressão observada por *immunoblotting*. Estudos prévios descrevem tais aglomerados perinucleares como regiões características de degradação protéica por proteossoma, sugerindo assim que a redução dos níveis de E-caderina observada pode ser devido a este tipo de degradação (WIGLEY et al., 1999; KOPITO, 2000). Adicionalmente, foi observada por imunofluorescência uma marcação citoplasmática e nuclear da β -catenina na F1 5Gy HT-29, seguida de um aumento também dos níveis de expressão dessa proteína, como observado por *immunoblotting*. Estudos anteriores mostraram que tanto células do *front* invasivo, em amostras de pacientes com câncer colorretal, quanto células que invadiram o estroma também apresentaram aumento de expressão e localização nuclear de β -catenina, sugerindo o desenvolvimento de EMT nessas células, com perda progressiva de E-caderina e aquisição de marcadores mesenquimais (FODDE ; BRABLETZ, 2007). Além disso, estudos *in vitro* em células diretamente atingidas pela radiação mostraram uma desorganização das junções celulares em tempos curtos após o tratamento (de CARVALHO et al., 2006). No presente estudo, reportamos pela primeira vez os efeitos da radiação sobre a adesão celular nas progênies que são derivadas de células de câncer colorretal que sobreviveram ao tratamento com a radiação. Além da desorganização das junções celulares, analisamos o perfil de distribuição subcelular e expressão da vimentina, um

filamento intermediário considerado marcador mesenquimal expresso em células metastáticas que se encontra ausente em células epiteliais normais (SABBAH et al., 2008; WEI et al., 2008; SATELLI; Li, 2011). Os resultados mostraram que a progênie Caco-2 não apresenta expressão do filamento intermediário vimentina, nem mesmo nas progênies derivadas de Caco-2 sobreviventes à radioterapia. Estudos prévios constataram que esta linhagem celular não apresenta níveis detectáveis dessa proteína (RUSU et al., 2005; MAKRODOULI et al., 2011). No entanto, as progênies derivadas de células HT-29 apresentam uma expressão basal de vimentina e observou-se um aumento dessa expressão na F1 5Gy HT-29, concomitante à intensa dispersão celular observada nessas mesmas progênies. Além disso, houve também uma redistribuição subcelular da vimentina na F1 5Gy HT-29, com os filamentos acompanhando as protrusões celulares. Embora a expressão de vimentina seja um marcador da EMT, poucos estudos demonstram sua funcionalidade no processo. Estudos prévios mostraram que a vimentina aumenta a migração celular e estabiliza a miosina durante a formação das protrusões celulares (LUND et al., 2010). Com intuito de caracterizar melhor o fenótipo dessas progênies, também foi analisado a organização do citoesqueleto de actina dessas células através da marcação da actina em sua forma filamentar, a F-actina. Foi possível observar na F1 5Gy Caco-2 a formação de protrusões de membrana do tipo lamelipódio, com "ruffles" de membrana na extremidade frontal de direcionamento do movimento celular (*leading edge*). Já na F1 5Gy HT-29, observa-se um perfil de marcação da F-actina diferenciado, com a formação de lamelipódios restritos na extremidade que direciona o movimento e uma longa retração caudal; aquisição de um formato fibroblástico; e uma evidente dispersão celular, características de células altamente migratórias (PETRIE et al., 2009). Sendo assim, uma vez que a desorganização dos complexos de adesão celular, bem como alterações no citoesqueleto, favorecem o aumento da capacidade migratória das células, analisou-se a migração celular através do ensaio de *wound healing*. Foi observado que a F1 5Gy Caco-2 apresenta um perfil de migração mais lento quando comparada à sua F1 Controle Caco-2 e à F1 5Gy HT-29. Tal fato pode estar relacionado aos tipos diferenciados de protrusões de membrana formados nessas progênies, uma vez que na F1 5Gy Caco-2 forma-se um lamelipódio extenso e com um raio amplo na *leading edge*, produzindo forças multivetoriais que resultam em uma migração randômica, e dessa forma, impedindo uma migração eficiente e direcionada (PETRIE et al., 2009; FRIEDL et al., 2012). Por outro lado, a F1 5Gy HT-29 apresentou um aumento da migração celular, que pode estar relacionado com o tipo de protrusão formada e a aquisição de um formato fibroblástico dessas células,

formando uma *leading edge* dominante que permite realizar uma migração mais direcionada (PETRIE et al., 2009). Outro aspecto importante é a capacidade da vimentina de gerar a força motriz dos filamentos de actina via fosforilação da proteína VASP (uma proteína inibitória do capeamento das extremidades dos filamentos de actina), promovendo assim o alongamento desses filamentos e permitindo a formação de protruções de membrana para potencializar a migração celular (LUND et al., 2010). Dessa forma, os resultados sugerem que a presença de níveis basais de vimentina nas progênies provenientes de HT-29 irradiadas, bem como alterações no seu perfil de localização e aumento da expressão na F1 5Gy HT-29, poderiam auxiliar tanto na aquisição de uma morfologia fibroblástica (que não é observada na F1 5Gy Caco-2, a qual não possui vimentina) quanto no aumento do potencial migratório observado nessa progênie.

É bem estabelecido que a aquisição de uma morfologia semelhante à fibroblástica pelas células epiteliais pode favorecer a migração e invasividade de células metastáticas que estão sob o desenvolvimento de EMT e escapam do tumor primário. Análises histopatológicas de CCR mostram células isoladas e com características de EMT no *front* invasivo dos tumores (PRALL, 2007; LUGLI et al., 2012; MITROVIC et al., 2012). Com intuito de avaliar também a capacidade invasiva dessas progênies derivadas de células sobreviventes à RT, foi realizado o ensaio de invasão celular. Os resultados mostraram que tanto a F1 Controle quanto a F1 5Gy de Caco-2 não foram capazes de invadir o matrigel, enquanto que foi observado um aumento significativo da invasividade das células F1 5Gy HT-29, quando comparadas à sua F1 Controle HT-29 (Fig.18 A). Paralelamente, foi observado também um aumento da atividade metaloproteinase (MMP-2) nessas progênies mais invasivas (Fig.18 B). Sabe-se que as metaloproteinases apresentam um papel importante na migração e invasão celular, sendo o aumento de sua expressão associado à progressão tumoral, indiferenciação celular, estadiamento avançado, metástase e pior prognóstico (DERYUGINA ; QUIGLEY, 2006). Além disso, estudos mostraram um aumento da atividade de MMP-2 em amostras de pacientes com CCR humano e (MURNANE et al., 2009; HERSZÉNYI et al., 2012) após o tratamento com radioterapia pré-operatória (dose fracionada de 5Gy), também em pacientes com este tipo de câncer (KUMAR et al., 2000).

Diversas vias de sinalização podem ser ativadas após a perda de E-caderina, incluindo àquelas relacionadas à atividade de β -catenina (ONDER et al., 2008). Estudos mostram que nas células do *front* invasivo de tumores colorretais, ocorre um acúmulo de β -catenina no citoplasma, o que leva a sua translocação nuclear e ativação da via Wnt/ β -catenina (FODDE ;

BRABLETZ, 2007; MAHER et al., 2009). Devido ao aumento de expressão de β -catenina e localização nuclear observado na progênie mais migratória e invasiva F1 5Gy HT-29 (Fig. 14), analisamos os eventos relacionados à ativação da via Wnt/ β -catenina. Primeiramente, analisou-se o status de fosforilação da GSK-3 β , uma proteína integrante do complexo fosfodestrutivo da β -catenina e cuja atividade é regulada por fosforilação no resíduo de serina 9 (SER-9). Uma vez fosforilada, esta proteína encontra-se na sua forma inativa e, portanto, incapaz de direcionar a β -catenina citoplasmática para a degradação por proteossoma. Os resultados mostram um aumento da fosforilação do resíduo SER-9 na F1 5Gy HT-29 quando comparadas à sua F1 Controle, corroborando o aumento da expressão de β -catenina observado nessas progênies. Porém, o aumento de β -catenina citoplasmática pode favorecer sua translocação ao núcleo, mas nem sempre isso ocorre [MAHER et al., 2009]. Neste sentido, para verificarmos se isto estaria acontecendo no nosso modelo, avaliamos a atividade do *TCF/LEF* através do ensaio luciferase *reporter*, no qual o plasmídeo inserido nas células possui sequências específicas na região promotora de *TCF/LEF* para ligação de β -catenina. Concomitante à fosforilação de GSK-3 β , foi observado um aumento da atividade do *TCF/LEF* nas F1 5Gy HT-29 (Fig.19 A e B) indicando claramente um aumento da atividade transcricional de β -catenina nessas progênies derivadas de células HT-29 irradiadas quando comparadas à sua progênie controle.

A alta frequência de alterações de componentes da via WNT/ β -catenina detectadas ultimamente em diversos tipos de cânceres, seja por mutações ou não, demonstra a importância desta via tanto no processo de carcinogênese quanto na progressão tumoral (ANASTAS ; MOON, 2013). A β -catenina também regula a expressão de outros fatores importantes no processo metastático, como a expressão de MMPs e coordena diretamente alterações na morfologia e em diversas vias de sinalização relacionadas com a migração e invasão celular (ANGERS ; MOON, 2009). Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que a radioterapia estaria promovendo atividade transcricional de β -catenina na progênie de células HT-29 que sobreviveram ao tratamento, modulando o aumento da migração, invasividade e atividade metaloproteinase observado nas F1 5Gy HT-29.

A ativação da via de β -catenina/*TCF/LEF* em câncer frequentemente ativa o programa transcricional relacionado a EMT, no qual genes que regulam o fenótipo epitelial (reguladores de polaridade celular e adesão); a aquisição de um fenótipo mesenquimal; e genes que controlam migração e invasão, são transcricionalmente alterados (THIERY; SLEEMAN, 2006). Sendo assim, avaliamos o quanto a aquisição da morfologia fibroblástica e o aumento

da migração e invasividade das progênies de F1 5Gy HT-29 mediadas pela ativação de *TCF/LEF* via β -catenina estaria relacionada com o desenvolvimento de EMT, através da análise de expressão gênica de marcadores desse processo por qRT-PCR. Foi possível observar uma redução da expressão de E-caderina a nível transcricional, concomitante com um aumento significativo da expressão gênica de seus repressores Snail e Slug, além de uma tendência de aumento de Twist. Ainda, observou-se um aumento significativo do marcador mesenquimal Fibronectina e também um aumento não significativo de N-caderina. Não foi observada uma alteração à nível transcricional da vimentina, sugerindo que o aumento de sua expressão observado na Fig. 15, possa ser devido ao aumento da estabilidade dessa proteína e consequentemente, redução de seu *turnover*. Estudos anteriores relataram o desenvolvimento de EMT induzido pela radiação em células de carcinoma de pulmão (NAGARAJAN et al., 2012) e em modelos xenográficos de carcinoma hepatocelular seguido pelo desenvolvimento de metástases tardias, sugerindo assim o potencial metastático de células residuais que sobrevivem à radioterapia (LI et al., 2011). Além disso, é importante mencionar que as células podem sofrer alterações adaptativas após a radioterapia e tais alterações podem envolver, por exemplo, a EMT (THIERY et al., 2009; SINGH ; SETTLEMAN, 2010). Embora a grande maioria dos estudos descreva qualquer alteração relacionada à aquisição de uma morfologia fibroblástica como sendo EMT, neste trabalho as alterações observadas na progênie F1 5Gy HT-29 foram consideradas como a aquisição de um fenótipo EMT-like, uma vez que a perda completa de marcadores epiteliais e o ganho de marcadores mesenquimais é raramente observado (DE CRAENE ; BERX, 2013), e uma EMT com uma dediferenciação parcial, como por exemplo, a expressão remanescente de E-caderina concomitante com aumento de marcadores mesenquimais foram observadas neste estudo na progênie mais migratória e invasiva, F1 5Gy HT-29.

Transpondo para a clínica, células tumorais sugestivas de terem desenvolvido EMT têm sido descritas histologicamente como *buddings* tumorais, definidos como células isoladas ou aglomerados de células desdiferenciadas no *front* invasivo de amostras de CCR (PRALL, 2007). Atualmente, os *buddings* tumorais são considerados como fator prognóstico adicional e têm recebido muita atenção, uma vez que o *budding* tem sido postulado como marcador histológico de EMT em amostras histológicas e acredita-se que sejam responsáveis por eventos subsequentes como a invasão e metástases, particularmente em carcinomas colorretais (LUGLI et al., 2012; MITROVIC et al., 2012).

Outro ponto importante a ser mencionado, é que os mecanismos de resistência terapêutica e invasão são considerados processos distintos, sendo estudados separadamente. Porém, vias de sinalização de pró-sobrevivência e indutoras de migração celular, como PI3K/Akt, Ras e Rho-GTPase, integrinas, caderinas e p53, se interconectam e se sobrepõem ao longo da progressão tumoral após um determinado tratamento, sendo que a aquisição de um fenótipo móvel contribui para a aquisição de resistência e vice versa (ALEXANDER ; FRIEDL, 2012), tornando assim extremamente relevante o estudo do comportamento de células remanescentes ao tratamento e suas descendentes.

Neste trabalho, mostramos os efeitos transgeracionais induzidos pela radiação na progênie de células de CCR que sobreviveram à radioterapia. Os resultados demonstram que células com radiorresistência intermediária, HT-29, podem gerar progênies mais agressivas e com características *EMT-like*. Tal observação poderia auxiliar no entendimento dos mecanismos moleculares de progressão do câncer relacionada à radiorresistência das células tumorais. Além disso, não necessariamente o fenótipo mais radiorresistente adquire vantagens malignas como aumento da capacidade migratória e invasiva após sobreviverem ao tratamento, como no caso da F1 Caco-2. Esta é uma observação importante no que diz respeito à heterogeneidade do tumor, onde coexistem células com vários graus de diferenciação, diferentes níveis de radiorresistência e habilidades malignas, e a grande maioria dos estudos focam somente nas células mais resistentes como novos alvos terapêuticos com intuito de aumentar o sucesso do tratamento. Adicionalmente, sugerimos que os componentes da via de sinalização WNT/ β -catenina poderiam constituir importantes alvos terapêuticos em combinação com a radioterapia, com o objetivo de reduzir o potencial migratório e invasivo das células remanescentes após a RT. Estudos recentes vêm mostrando a importância dessa via como alvo terapêutico em diversos tipos de câncer e novas moléculas vêm sendo desenvolvidas para a inibição de componentes da via WNT/ β -catenina/*TCF-LEF* (WATANABE; DAI, 2011), sendo a descoberta de inibidores da função da β -catenina nuclear um alvo extremamente promissor. Um fato interessante é que a grande maioria dos trabalhos relaciona a ativação dessa via somente com o aumento da proliferação celular e sobrevivência, sendo inclusive bem estabelecida nos momentos iniciais da tumorigênese colorretal através da formação de pólipos em CCR, como mencionada anteriormente. Sendo assim, as moléculas desenvolvidas com intuito de inibir essa via têm seu foco somente na inibição da proliferação celular e sobrevivência (HANDELI; SIMON, 2008; WHITT et al., 2012; YAO et al., 2011). Porém, raros são os estudos que relacionam esta via com a migração

celular e este é o primeiro estudo que mostra a ativação dessa via nas progênes descendentes de células HT-29 irradiadas e relacionam essa via com aumento de migração e invasão após a sobrevivência à radioterapia.

Sob o aspecto da análise do perfil de glicosilação nessas progênes mais invasivas, trabalhos anteriores do nosso grupo mostraram que o tratamento com inibidores da biossíntese de *N*-glicanos foi capaz tanto de reestabelecer as adesões celulares quanto aumentar a radiosensibilidade e o efeito citotóxico mediado por diferentes quimioterápicos em células de CCR humano, HCT-116 (de FREITAS JUNIOR et al., 2011; de-FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Sendo assim, com intuito de continuar a caracterização das progênes derivadas de células que sobrevivem à radioterapia analisadas no presente estudo, as quais apresentam características mais agressivas, e com o objetivo de ir além da caracterização clássica quanto ao desenvolvimento de marcadores relacionados ao fenótipo de EMT sugeridos, foram avaliadas características relacionadas ao perfil de glicosilação dessas progênes.

Uma vez que a maioria dos biomarcadores sorológicos para o câncer são proteínas *N*-glicosiladas e que a desregulação da glicosilação *N*-ligada de proteínas vem sendo associada à progressão maligna (GORELIK et al., 2001; TAKAHASHI et al., 2009), as progênes F1 Controle e F1 5Gy de HT-29 foram submetidas à análise global do perfil de *N*-glicosilação (Fig.21) Os resultados mostraram que as F1 5Gy HT-29 apresentam um aumento da marcação por lectinas do tipo L-PHA, que reconhecem glicanos complexos ramificados (carboidratos específicos de ligação oligossacarídea do tipo β -16) e que constituem produtos da enzima GnT-V (TANIGUCHI et al., 2006). Foi possível observar o aumento de *N*-glicosilação de proteínas presentes em algumas faixas de peso molecular de 100 a 150 kDa; 75 kDa e na faixa dos 50 kDa. A ramificação de proteínas com glicanos tipo *N*-ligado está envolvida em diversas funções como sinalização, adesão, migração e invasão celular (ZHAO et al., 2008a). não sendo descritas até o momento, alterações desse tipo em células que sobrevivem à radioterapia.

Em seguida, foram realizados géis 2D com o objetivo de aumentar a resolução de separação proteica e avaliar tanto alterações de expressão quanto potenciais alvos hiperglicosilados nessa progênes derivadas de células HT-29 que sobrevivem à RT. Na Fig. 22, é observada uma alteração de expressão proteica global nos géis corados com *Comassie Blue*, com alguns *spots* na F1 5Gy HT-29 claramente alterados quando comparadas à F1 Controle HT-29. Neste primeiro momento, chamamos a atenção para as proteínas presentes na faixa de peso entre 100 kDa e 150 kDa, onde ocorre uma redução expressiva dessas

proteínas na F1 5Gy HT-29 (setas em rosa na Fig. 21). Em seguida, membranas de nitrocelulose contendo as proteínas separadas por peso molecular e ponto isoelétrico, foram submetidas à marcação com a lectina L-PHA com intuito de avaliar com maior resolução, as proteínas com diferenças no perfil de N-glicosilação. Confirmando o resultado obtido no gel 1D (Fig.21), foi possível observar alterações no perfil de N-glicosilação de algumas proteínas específicas, particularmente um aumento de glicosilação das proteínas na faixa de peso molecular de aproximadamente a 120 kDa na F1 5Gy HT-29 (como indicado pelas setas amarelas na Fig. 21). De forma interessante, a imunomarcação para E-caderina (marcadas pelas setas azuis) coincide com aquela de peso molecular reconhecida pela lectina m L-PHA, sugerindo que esta proteína seja a E-caderina. Além disso, esses resultados confirmaram a redução da expressão de E-caderina na F1 5Gy HT-29 observada em nosso modelo de estudo, bem como sugerem que a proteína E-caderina esteja hiperglicosilada nas F1 5Gy HT-29.

Estudos anteriores correlacionam o aumento da atividade de GnT-V (enzimas que produzem os glicanos ramificados reconhecidos por L-PHA) com a desestabilização das junções celulares (ZHAO et al., 2008a). Porém, não é descrito se este tipo de modificação pós traducional de E-caderina está relacionado ao seu direcionamento para degradação. Além disso, os resultados obtidos até o momento proporcionam um painel de moléculas alteradas tanto à nível proteico quanto à nível de modificações pós traducionais, sendo importante para futuras análises e continuação do atual projeto em estudo.

Um estudo recente mostrou que o desenvolvimento EMT foi correlacionado com a redução da expressão da enzima GnT-III, a qual catalisa a adição de uma N-acetilglicosamina bisectante a N-glicanos nascentes (PINHO et al., 2012). É conhecido que as enzimas GnT-III e GnT-V atuam de maneira antagônica e a redução da atividade de uma regula positivamente a atividade da outra (SCHACHTER, 1986). Sendo assim, pode-se sugerir que o aumento glicanos *N*-ligados reconhecidos por L-PHA pode estar relacionado à aquisição de um fenótipo *EMT-like*. Além disso, um estudo utilizando camundongo transgênico para superexpressão de GnT-V, mostrou um aumento do desenvolvimento de EMT em processos de cicatrização de pele (TERAO et al., 2011), mas não dentro do contexto da progressão tumoral. Uma vez que foi observada uma redução da expressão de E-caderina nas F1 5Gy HT-29 (Fig. 13B e Fig.22) e um sugestivo direcionamento dessa proteína à degradação (Fig.13A), ensaios de imunoprecipitação seguidos de marcação com lectina L-PHA foram realizados para verificar o perfil de *N*-glicosilação especificamente da molécula de E-caderina. Os resultados da Fig. 23 confirmaram mais uma vez a redução da expressão de E-

caderina nas F1 5Gy HT-29, quando comparadas à sua F1 Controle. Além disso, os resultados mostraram que as moléculas de E-caderina remanescentes na F1 5Gy HT-29 encontravam-se hiperglicosiladas quando comparadas às E-caderinas da F1 controle HT-29. Esses resultados corroboram o observado na fluorescência da Fig. 23, onde células com aumento da marcação para L-PHA apresentam baixa marcação de E-caderina, sugerindo que esse tipo de glicosilação pode estar envolvido no direcionamento da E-caderina para degradação.

Embora seja conhecido o papel da glicosilação ao longo da síntese de proteínas e sua importância em processos relacionados ao controle do enovelamento e direcionamento das proteínas para sítios específicos na célula (BOSCHER et al., 2011), não têm sido relatadas alterações do perfil de glicosilação de proteínas após tratamentos como a radioterapia, tampouco a influência dessas modificações em alterações de fenótipo e resistência terapêutica.

De fato, as funções biológicas da E-caderina podem ser moduladas pela presença de diferentes glicanos (LAGANA et al., 2006; PINHO et al., 2009a; PINHO et al., 2009b). É importante mencionar também, que neste primeiro momento, estamos interessados em avaliar se a glicosilação da E-caderina mediada por GnT-V está envolvida na redução da sua expressão nas progênies derivadas de células HT-29 irradiadas e se este evento corrobora o desenvolvimento do fenótipo EMT-*like* em nosso modelo de estudo. Além disso, estudos mostraram que a expressão de GnT-V é associada a um pior prognóstico de pacientes com CCR (MURATA et al., 2000) e como mencionado anteriormente, alterações no perfil de glicosilação de diversas proteínas podem modular importantes funções relacionadas com a progressão tumoral, como migração e invasividade, características que também foram encontradas em nosso modelo de estudo. Sendo assim, outras proteínas além da E-caderina, podem estar sendo glicosiladas, podendo também influenciar nesses eventos.

Outro ponto importante, é que a glicosilação participa ativamente do controle de qualidade do enovelamento proteico, e distúrbios de glicosilação de proteínas são conhecidos por induzirem stress de retículo, com acúmulo progressivo de proteínas mal enoveladas e ativação de vias de morte celular, a chamada UPR (do inglês, *unfolded protein response*) (SMITH; DESHMUKH, 2007; CLARKE et al., 2012). Portanto, estudos futuros são necessários para avaliar o papel da inibição da síntese desses N-glicanos tanto no processo de reversão do fenótipo mais migratório e invasivo adquirido pelas progênies de células HT-29 que sobrevivem à radioterapia como também no aumento da resposta terapêutica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante muito tempo, teorias centradas no genoma eram extremamente promissoras no que diz respeito à descoberta da origem do câncer e conseqüentemente ao desenvolvimento de novos tratamentos revolucionários. Porém, no âmbito dos conceitos modernos da farmacologia e da biologia celular e molecular, os estudos vêm mostrando que essa teoria centrada no DNA contribui, mas não reflete na solução de diversos problemas relacionados à terapêutica do câncer. É necessário atentar-se também à grande diversidade fenotípica que é desenvolvida por mecanismos pós transcricionais e pós traducionais, os quais constituem alvos mais facilmente "*Drugables*", ou seja, passíveis de serem alvos potenciais para o desenvolvimento de novos medicamentos (KARVE ; CHEEMA, 2011). Assim, torna-se de extrema importância caracterizar os fenótipos adquiridos ao longo da progressão do câncer e da pressão seletiva induzida pelos tratamentos administrados, uma vez que essas células que são capazes de sobreviver à esse microambiente extremamente tóxico constituem as principais responsáveis pela repopulação do tumor e/ou desenvolvimento de metástases refratárias. Tal observação vem ganhando destaque na pesquisa relacionada à resposta terapêutica, conforme observado no estudo publicado pelo grupo do Hanahan em 2013. Tal estudo avalia a correlação entre a resposta terapêutica a diversos quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer colorretal e fenótipo celular, propondo assim uma mudança de paradigma no que diz respeito ao direcionamento terapêutico, o qual seria realizado de acordo com os subtipos celulares encontrado no tumor (SADANANDAM et al., 2013).

Sendo assim, com base nos resultados obtidos no presente estudo concluímos que células com uma radiorresistência intermediária, como no caso da HT-29, que sobrevivem ao tratamento com a radiação são capazes de dar origem à progêneses mais agressivas e com fenótipo *EMT-like*, apresentando um aumento do potencial maligno e ativação da via Wnt/ β -catenina. Dessa forma, esta via pode ser um alvo importante para novas combinações terapêuticas em conjunto com a radioterapia, com intuito de reduzir o potencial migratório e invasivo das células que sobrevivem ao tratamento. Enfatizamos que não necessariamente o fenótipo mais resistente, no caso das células Caco-2, é o que adquire vantagens malignas após sobreviverem o tratamento, como mostrado no presente trabalho. Esta é uma observação importante no que diz respeito à heterogeneidade do tumor, onde coexistem células em diversos níveis de diferenciação e capacidades malignas, e a maioria dos estudos consideram

somente a subpopulação mais resistente como o principal alvo a ser atingido para aumentar a eficácia terapêutica.

Os resultados sugerem também que a *N*-glicosilação participe do processo de degradação de E-caderina e desestabilização da adesão celular, eventos chaves que ocorrem durante o processo de EMT. Considerando que a EMT é caracterizada por modificações na adesão celular, polaridade, migração e morfologia; e que os glicanos atuam diretamente na mediação desses eventos, torna-se de grande importância a correlação entre essas modificações pós-traducionais e o desenvolvimento de um fenótipo relacionado à EMT, como observado no nosso modelo de estudo. Assim, é possível incluir as alterações no perfil de expressão de *N*-glicanos como característica importante na aquisição do fenótipo *EMT-like* desenvolvido em progênies derivadas de HT-29 que sobrevivem à radioterapia, uma vez que suas progênies apresentam um aumento da expressão desses *N*-glicanos complexos.

E finalmente, considerando que o tratamento do CCR é baseado nos mesmos compostos há mais de 40 anos, a identificação de novas vias de sinalização e novos mecanismos moleculares envolvidos na resistência terapêutica e aquisição de invasividade após o tratamento é de extrema relevância. Tal fato possibilita sugerir alvos potenciais para novas combinações de tratamento, além de abrir novos horizontes para o desenvolvimento de projetos dentro da Instituição com intuito de realizar uma pesquisa translacional que resulte, ou pelo menos tente, algum dia, trazer melhorias concretas para o tratamento de pacientes com câncer.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Células com uma radiorresistência intermediária, (HT-29) que sobrevivem à RT são capazes de dar origem à progênes mais agressivas e com fenótipo *EMT-like*, com um aumento do potencial maligno e ativação da via Wnt/ β -catenina.
- ✓ A via Wnt/ β -catenina pode ser um alvo importante para novas combinações terapêuticas em conjunto com a RT, com intuito de reduzir o potencial migratório e invasivo das células que sobrevivem ao tratamento.
- ✓ Os resultados sugerem também que a *N*-glicosilação participe do processo de degradação de E-caderina e desestabilização da adesão celular, eventos chaves que ocorrem durante o processo de EMT.; e que as alterações no perfil de expressão de *N*-glicanos constituem características importantes na aquisição do fenótipo *EMT-like* desenvolvido em progênes derivadas de HT-29 que sobrevivem à radioterapia, uma vez que suas progênes apresentam um aumento da expressão desses *N*-glicanos complexos.

Referências

- Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. 2013. **Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines.** *Oncogenesis* 2:e71.
- Ahmed KM, Li JJ. 2008. **NF-kappa B-mediated adaptive resistance to ionizing radiation.** *Free Radic Biol Med* 44:1-13.
- Ahnen DJ. 2011. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--**the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived?** *Am J Gastroenterol* 106:190-8.
- Alexander S, Friedl P. 2012. **Cancer invasion and resistance: interconnected processes of disease progression and therapy failure.** *Trends Mol Med* 18:13-26.
- Anastas JN, Moon RT. 2013. **WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer.** *Nat Rev Cancer* 13:11-26.
- Andarawewa KL, Costes SV, Fernandez-Garcia I, Chou WS, Ravani SA, Park H, Barcellos-Hoff MH. 2011. **Lack of radiation dose or quality dependence of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) mediated by transforming growth factor β .** *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 79:1523-31.
- Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, Mott JD, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. 2007. **Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition.** *Cancer Res* 67:8662-70.
- Angers S, Moon RT. 2009. **Proximal events in Wnt signal transduction.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:468-77.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. **On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database.** *Biochim Biophys Acta* 1473:4-8.
- Barcellos-Hoff MH, Park C, Wright EG. 2005. **Radiation and the microenvironment - tumorigenesis and therapy.** *Nat Rev Cancer* 5:867-75.
- Barrallo-Gimeno A, Nieto MA. 2005. **The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer.** *Development* 132:3151-61.

Benson AB, Bekaii-Saab T, Chan E, Chen YJ, Choti MA, Cooper HS, Engstrom PF, Enzinger PC, Fakih MG, Fenton MJ, Fuchs CS, Grem JL, Hunt S, Kamel A, Leong LA, Lin E, May KS, Mulcahy MF, Murphy K, Rohren E, Ryan DP, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Small W, Sofocleous CT, Venook AP, Willett CG, Gregory KM, Freedman-Cass DA. 2013. **Metastatic colon cancer, version 3.2013: featured updates to the NCCN Guidelines.** J Natl Compr Canc Netw 11:141-52; quiz 152.

Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. 2011. **A continuum model for tumour suppression.** Nature 476:163-9.

Bertozzi CR, Kiessling LL. 2001. **Chemical glycobiology.** Science 291:2357-64.

Boland CR, Goel A. 2010. **Microsatellite instability in colorectal cancer.** Gastroenterology 138:2073-2087.e3.

Boscher C, Dennis JW, Nabi IR. 2011. **Glycosylation, galectins and cellular signaling.** Curr Opin Cell Biol 23:383-92.

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. 2012. **Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study.** Lancet Oncol 13:790-801.

Bryant DM, Stow JL. 2004. **The ins and outs of E-cadherin trafficking.** Trends Cell Biol 14:427-34.

Buonanno M, de Toledo SM, Pain D, Azzam EI. 2011. **Long-term consequences of radiation-induced bystander effects depend on radiation quality and dose and correlate with oxidative stress.** Radiat Res 175:405-15.

Centelles JJ. 2012. **General aspects of colorectal cancer.** ISRN Oncol 2012:139268.

Clarke R, Cook KL, Hu R, Facey CO, Tavassoly I, Schwartz JL, Baumann WT, Tyson JJ, Xuan J, Wang Y, Warri A, Shajahan AN. 2012. **Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate.** Cancer Res 72:1321-31.

Clevers H, Nusse R. 2012. **Wnt/ β -catenin signaling and disease.** Cell 149:1192-205.

Coghlin C, Murray GI. 2010. **Current and emerging concepts in tumour metastasis.** J Pathol 222:1-15.

Condeelis J, Segall JE. 2003. **Intravital imaging of cell movement in tumours**. Nat Rev Cancer 3:921-30.

Contessa JN, Bhojani MS, Freeze HH, Rehemtulla A, Lawrence TS. 2008. **Inhibition of N-linked glycosylation disrupts receptor tyrosine kinase signaling in tumor cells**. Cancer Res 68:3803-9.

Cottu PH, Muzeau F, Estreicher A, Fléjou JF, Iggo R, Thomas G, Hamelin R. 1996. **Inverse correlation between RER+ status and p53 mutation in colorectal cancer cell lines**. Oncogene 13:2727-30.

Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, Ouyang J, Ilarregui JM, Toscano MA, Domaica CI, Croci MC, Shipp MA, Mesri EA, Albini A, Rabinovich GA. 2012. **Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma**. J Exp Med 209:1985-2000.

Altieri, DC. **Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery**. Nature Reviews Cancer 8: 61-70.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; Ministério da Saúde. 2013. **Estimativa 2014. Rio de Janeiro**.

de Carvalho AD, de Souza W, Morgado-Díaz JA. 2006. **Morphological and molecular alterations at the junctional complex in irradiated human colon adenocarcinoma cells, Caco-2**. Int J Radiat Biol 82:658-68.

De Craene B, Berx G. 2013. **Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression**. Nat Rev Cancer 13:97-110.

de Freitas Junior JC, Silva BuR, de Souza WF, de Araújo WM, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. 2011. **Inhibition of N-linked glycosylation by tunicamycin induces E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and inhibits cell proliferation in undifferentiated human colon cancer cells**. Cancer Chemother Pharmacol 68:227-38.

de-Freitas-Junior JC, Bastos LG, Freire-Neto CA, Rocher BD, Abdelhay ES, Morgado-Díaz JA. 2012. **N-glycan biosynthesis inhibitors induce in vitro anticancer activity in colorectal cancer cells**. J Cell Biochem 113:2957-66.

de-Freitas-Junior JC, Carvalho S, Dias AM, Oliveira P, Cabral J, Seruca R, Oliveira C, Morgado-Díaz JA, Reis CA, Pinho SS. 2013. **Insulin/IGF-I signaling pathways enhances tumor cell invasion**

through bisecting GlcNAc N-glycans modulation. an interplay with E-cadherin. PLoS One 8:e81579.

Dell A, Morris HR. 2001. **Glycoprotein structure determination by mass spectrometry.** Science 291:2351-6.

Deryugina EI, Quigley JP. 2006. **Matrix metalloproteinases and tumor metastasis.** Cancer Metastasis Rev 25:9-34.

Deveraux QL, Reed JC. 1999. **IAP family proteins--suppressors of apoptosis.** Genes Dev 13:239-52.

Dote H, Cerna D, Burgan WE, Camphausen K, Tofilon PJ. 2005. **ErbB3 expression predicts tumor cell radiosensitization induced by Hsp90 inhibition.** Cancer Res 65:6967-75.

Edge SB, Compton CC. 2010. **The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM.** Ann Surg Oncol 17:1471-4.

Ewing I, Hurley JJ, Josephides E, Millar A. 2014. **The molecular genetics of colorectal cancer.** Frontline Gastroenterol 5:26-30.

Fakih M. 2013. **Targeted therapies in colorectal cancer: the dos, don'ts, and future directions.** J Gastrointest Oncol 4:239-44.

Fearon ER. 2011. **Molecular genetics of colorectal cancer.** Annu Rev Pathol 6:479-507.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. 2010. **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** Int J Cancer 127:2893-917.

Flatmark K, Maelandsmo GM, Martinsen M, Rasmussen H, Fodstad Ø. 2004. **Twelve colorectal cancer cell lines exhibit highly variable growth and metastatic capacities in an orthotopic model in nude mice.** Eur J Cancer 40:1593-8.

Fodde R, Brabletz T. 2007. **Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior.** Curr Opin Cell Biol 19:150-8.

Frame S, Cohen P. 2001. **GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery.** Biochem J 359:1-16.

- Fredman P, Hedberg K, Brezicka T. 2003. **Gangliosides as therapeutic targets for cancer.** *BioDrugs* 17:155-67.
- Friedl P, Locker J, Sahai E, Segall JE. 2012. **Classifying collective cancer cell invasion.** *Nat Cell Biol* 14:777-83.
- Friedl P, Wolf K. 2003. **Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms.** *Nat Rev Cancer* 3:362-74.
- Friedl P, Wolf K. 2010. **Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model.** *J Cell Biol* 188:11-9.
- Giepmans BN, van Ijzendoorn SC. 2009. **Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains.** *Biochim Biophys Acta* 1788:820-31.
- Glynn-Jones R. 2012. **Neoadjuvant treatment in rectal cancer: do we always need radiotherapy-or can we risk assess locally advanced rectal cancer better? Recent Results Cancer Res** 196:21-36.
- Gorelik E, Galili U, Raz A. 2001. **On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis.** *Cancer Metastasis Rev* 20:245-77.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. 2002. **Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters.** *Nat Rev Cancer* 2:48-58.
- Granovsky M, Fata J, Pawling J, Muller WJ, Khokha R, Dennis JW. 2000. **Suppression of tumor growth and metastasis in Mgat5-deficient mice.** *Nat Med* 6:306-12.
- Guruswamy S, Rao CV. 2008. **Multi-Target Approaches in Colon Cancer Chemoprevention Based on Systems Biology of Tumor Cell-Signaling.** *Gene Regul Syst Bio* 2:163-176.
- Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. 2007. **Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects.** *J Radiat Res* 48:87-95.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* 144:646-74.
- Handeli S, Simon JA. 2008. **A small-molecule inhibitor of Tcf/beta-catenin signaling down-regulates PPARgamma and PPARdelta activities.** *Mol Cancer Ther* 7:521-9.
- Harris TJ, Tepass U. 2010. **Adherens junctions: from molecules to morphogenesis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:502-14.

- Hayot C, Debeir O, Van Ham P, Van Damme M, Kiss R, Decaestecker C. 2006. **Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration.** *Toxicol Appl Pharmacol* 211:30-40.
- Herszényi L, Hritz I, Lakatos G, Varga MZ, Tulassay Z. 2012. **The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer.** *Int J Mol Sci* 13:13240-63.
- Hou JM, Krebs M, Ward T, Sloane R, Priest L, Hughes A, Clack G, Ranson M, Blackhall F, Dive C. 2011. **Circulating tumor cells as a window on metastasis biology in lung cancer.** *Am J Pathol* 178:989-96.
- Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. 2006. **The paradox of response and survival in cancer therapeutics.** *Blood* 107:431-4.
- Iijima J, Zhao Y, Isaji T, Kameyama A, Nakaya S, Wang X, Ihara H, Cheng X, Nakagawa T, Miyoshi E, Kondo A, Narimatsu H, Taniguchi N, Gu J. 2006. **Cell-cell interaction-dependent regulation of N-acetylglucosaminyltransferase III and the bisected N-glycans in GE11 epithelial cells. Involvement of E-cadherin-mediated cell adhesion.** *J Biol Chem* 281:13038-46.
- Jamora C, Fuchs E. 2002. **Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton.** *Nat Cell Biol* 4:E101-8.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. 2010. **Hereditary and familial colon cancer.** *Gastroenterology* 138:2044-58.
- Jass JR. 2007. **Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features.** *Histopathology* 50:113-30.
- Jeanes A, Gottardi CJ, Yap AS. 2008. **Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression?** *Oncogene* 27:6920-9.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011. **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 61:69-90.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. 2008. **Cancer statistics, 2008.** *CA Cancer J Clin* 58:71-96.
- Johnson ME, Howerth EW. 2004. **Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein.** *Vet Pathol* 41:599-607.

- Jung JW, Hwang SY, Hwang JS, Oh ES, Park S, Han IO. 2007. **Ionising radiation induces changes associated with epithelial-mesenchymal transdifferentiation and increased cell motility of A549 lung epithelial cells.** Eur J Cancer 43:1214-24.
- Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Putter H, Steup WH, Wiggers T, Rutten HJ, Pahlman L, Glimelius B, van Krieken JH, Leer JW, van de Velde CJ, Group DCC. 2001. **Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer.** N Engl J Med 345:638-46.
- Karve TM, Cheema AK. 2011. **Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease.** J Amino Acids 2011:207691.
- Kelley LC, Shahab S, Weed SA. 2008. **Actin cytoskeletal mediators of motility and invasion amplified and overexpressed in head and neck cancer.** Clin Exp Metastasis 25:289-304.
- Kim JJ, Tannock IF. 2005. **Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure.** Nat Rev Cancer 5:516-25.
- Knudson AG. 1985. **Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes.** Cancer Res 45:1437-43.
- Kopito RR. 2000. **Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.** Trends Cell Biol 10:524-30.
- Kosinski C, Li VS, Chan AS, Zhang J, Ho C, Tsui WY, Chan TL, Mifflin RC, Powell DW, Yuen ST, Leung SY, Chen X. 2007. **Gene expression patterns of human colon tops and basal crypts and BMP antagonists as intestinal stem cell niche factors.** Proc Natl Acad Sci U S A 104:15418-23.
- Kumar A, Collins HM, Scholefield JH, Watson SA. 2000. **Increased type-IV collagenase (MMP-2 and MMP-9) activity following preoperative radiotherapy in rectal cancer.** Br J Cancer 82:960-5.
- Lagadec C, Dekmezian C, Bauché L, Pajonk F. 2012. **Oxygen levels do not determine radiation survival of breast cancer stem cells.** PLoS One 7:e34545.
- Lagana A, Goetz JG, Cheung P, Raz A, Dennis JW, Nabi IR. 2006. **Galectin binding to Mgat5-modified N-glycans regulates fibronectin matrix remodeling in tumor cells.** Mol Cell Biol 26:3181-93.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. **Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition.** Nat Rev Mol Cell Biol 15:178-96.

- Lau KS, Dennis JW. 2008. **N-Glycans in cancer progression**. *Glycobiology* 18:750-60.
- Ledford H. 2011. **Cancer theory faces doubts**. *Nature* 472:273.
- Lee M, Lee HJ, Bae S, Lee YS. 2008. **Protein sialylation by sialyltransferase involves radiation resistance**. *Mol Cancer Res* 6:1316-25.
- Li CW, Xia W, Huo L, Lim SO, Wu Y, Hsu JL, Chao CH, Yamaguchi H, Yang NK, Ding Q, Wang Y, Lai YJ, LaBaff AM, Wu TJ, Lin BR, Yang MH, Hortobagyi GN, Hung MC. 2012. **Epithelial-mesenchymal transition induced by TNF- α requires NF- κ B-mediated transcriptional upregulation of Twist1**. *Cancer Res* 72:1290-300.
- Li T, Zeng ZC, Wang L, Qiu SJ, Zhou JW, Zhi XT, Yu HH, Tang ZY. 2011. **Radiation enhances long-term metastasis potential of residual hepatocellular carcinoma in nude mice through TMPRSS4-induced epithelial-mesenchymal transition**. *Cancer Gene Ther* 18:617-26.
- Liu Y, Bodmer WF. 2006. **Analysis of P53 mutations and their expression in 56 colorectal cancer cell lines**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:976-81.
- Liu ZZ, Huang WY, Lin JS, Li XS, Liang KH, Huang JL. 2005. **Cell cycle and radiosensitivity of progeny of irradiated primary cultured human hepatocarcinoma cells**. *World J Gastroenterol* 11:7033-5.
- Lowe JB, Marth JD. 2003. **A genetic approach to Mammalian glycan function**. *Annu Rev Biochem* 72:643-91.
- Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. 2012. **Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer**. *Br J Cancer* 106:1713-7.
- Lund N, Henrion D, Tiede P, Ziche M, Schunkert H, Ito WD. 2010. **Vimentin expression influences flow dependent VASP phosphorylation and regulates cell migration and proliferation**. *Biochem Biophys Res Commun* 395:401-6.
- Luo J. 2009. **Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy**. *Cancer Lett* 273:194-200.
- López I, P Oliveira L, Tucci P, Alvarez-Valín F, A Coudry R, Marín M. 2012. **Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer**. *Gene* 499:81-7.

- Maher MT, Flozak AS, Stocker AM, Chenn A, Gottardi CJ. 2009. **Activity of the beta-catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion.** J Cell Biol 186:219-28.
- Makrodouli E, Oikonomou E, Koc M, Andera L, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. 2011. **BRAF and RAS oncogenes regulate Rho GTPase pathways to mediate migration and invasion properties in human colon cancer cells: a comparative study.** Mol Cancer 10:118.
- Marcum JA, Rosenberg RD. 1985. **Heparinlike molecules with anticoagulant activity are synthesized by cultured endothelial cells.** Biochem Biophys Res Commun 126:365-72.
- Markowitz SD, Bertagnolli MM. 2009. **Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.** N Engl J Med 361:2449-60.
- McKeown RE. 2009. **The Epidemiologic Transition: Changing Patterns of Mortality and Population Dynamics.** Am J Lifestyle Med 3:19S-26S.
- Medema JP, Vermeulen L. 2011. **Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer.** Nature 474:318-26.
- Mita AC, Mita MM, Nawrocki ST, Giles FJ. 2008. **Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics.** Clin Cancer Res 14:5000-5.
- Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. 2012. **Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice.** Mod Pathol 25:1315-25.
- Miyoshi J, Takai Y. 2008. **Structural and functional associations of apical junctions with cytoskeleton.** Biochim Biophys Acta 1778:670-91.
- Moremen KW, Tiemeyer M, Nairn AV. 2012. **Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function.** Nat Rev Mol Cell Biol 13:448-62.
- Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. 2009. **Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells.** Breast Cancer Res Treat 117:261-71.
- Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niermann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. 2011. **Targeting the mechanisms of resistance to chemotherapy and radiotherapy with the cancer stem cell hypothesis.** J Oncol 2011:941876.

- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Iniesta P, Benito M. 2010. **Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance.** World J Gastrointest Oncol 2:151-8.
- Murata K, Miyoshi E, Kameyama M, Ishikawa O, Kabuto T, Sasaki Y, Hiratsuka M, Ohigashi H, Ishiguro S, Ito S, Honda H, Takemura F, Taniguchi N, Imaoka S. 2000. **Expression of N-acetylglucosaminyltransferase V in colorectal cancer correlates with metastasis and poor prognosis.** Clin Cancer Res 6:1772-7.
- Murnane MJ, Cai J, Shuja S, McAneny D, Klepeis V, Willett JB. 2009. **Active MMP-2 effectively identifies the presence of colorectal cancer.** Int J Cancer 125:2893-902.
- Nagarajan D, Melo T, Deng Z, Almeida C, Zhao W. 2012. **ERK/GSK3 β /Snail signaling mediates radiation-induced alveolar epithelial-to-mesenchymal transition.** Free Radic Biol Med 52:983-92.
- Nagy P, Vereb G, Sebestyén Z, Horváth G, Lockett SJ, Damjanovich S, Park JW, Jovin TM, Szöllosi J. 2002. **Lipid rafts and the local density of ErbB proteins influence the biological role of homo- and heteroassociations of ErbB2.** J Cell Sci 115:4251-62.
- Network CGA. 2012. **Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer.** Nature 487:330-7.
- Niessen CM, Gottardi CJ. 2008. **Molecular components of the adherens junction.** Biochim Biophys Acta 1778:562-71.
- Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. 2008. **Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways.** Cancer Res 68:3645-54.
- Pach R, Kulig J, Richter P, Gach T, Szura M, Kowalska T. 2012. **Randomized clinical trial on preoperative radiotherapy 25 Gy in rectal cancer--treatment results at 5-year follow-up.** Langenbecks Arch Surg 397:801-7.
- Palacios F, Tushir JS, Fujita Y, D'Souza-Schorey C. 2005. **Lysosomal targeting of E-cadherin: a unique mechanism for the down-regulation of cell-cell adhesion during epithelial to mesenchymal transitions.** Mol Cell Biol 25:389-402.
- Pancione M, Remo A, Colantuoni V. 2012. **Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression.** Patholog Res Int 2012:509348.

- Petrie RJ, Doyle AD, Yamada KM. 2009. **Random versus directionally persistent cell migration.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:538-49.
- Pinho SS, Carvalho S, Marcos-Pinto R, Magalhães A, Oliveira C, Gu J, Dinis-Ribeiro M, Carneiro F, Seruca R, Reis CA. 2013a. **Gastric cancer: adding glycosylation to the equation.** *Trends Mol Med* 19:664-76.
- Pinho SS, Figueiredo J, Cabral J, Carvalho S, Dourado J, Magalhães A, Gärtner F, Mendonça AM, Isaji T, Gu J, Carneiro F, Seruca R, Taniguchi N, Reis CA. 2013b. **E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V.** *Biochim Biophys Acta* 1830:2690-700.
- Pinho SS, Oliveira P, Cabral J, Carvalho S, Huntsman D, Gärtner F, Seruca R, Reis CA, Oliveira C. 2012. **Loss and recovery of Mgat3 and GnT-III Mediated E-cadherin N-glycosylation is a mechanism involved in epithelial-mesenchymal-epithelial transitions.** *PLoS One* 7:e33191.
- Pinho SS, Osório H, Nita-Lazar M, Gomes J, Lopes C, Gärtner F, Reis CA. 2009a. **Role of E-cadherin N-glycosylation profile in a mammary tumor model.** *Biochem Biophys Res Commun* 379:1091-6.
- Pinho SS, Reis CA, Paredes J, Magalhães AM, Ferreira AC, Figueiredo J, Xiaogang W, Carneiro F, Gärtner F, Seruca R. 2009b. **The role of N-acetylglucosaminyltransferase III and V in the post-transcriptional modifications of E-cadherin.** *Hum Mol Genet* 18:2599-608.
- Pino MS, Chung DC. 2010. **The chromosomal instability pathway in colon cancer.** *Gastroenterology* 138:2059-72.
- Pinto D, Clevers H. 2005. **Wnt control of stem cells and differentiation in the intestinal epithelium.** *Exp Cell Res* 306:357-63.
- Pokutta S, Weis WI. 2007. **Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts.** *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:237-61.
- Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sørli T, Kristensen VN, Lingjaerde OC, Børresen-Dale AL. 2010. **Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression.** *Mol Oncol* 4:98-118.

- Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. 2010. **DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome.** *Histopathology* 56:167-79.
- Prall F. 2007. **Tumour budding in colorectal carcinoma.** *Histopathology* 50:151-62.
- Pramateftakis MG, Kanellos D, Tekkis PP, Touroutoglou N, Kanellos I. 2012. **Rectal cancer: multimodal treatment approach.** *Int J Surg Oncol* 2012:279341.
- Prise KM, Schettino G, Folkard M, Held KD. 2005. **New insights on cell death from radiation exposure.** *Lancet Oncol* 6:520-8.
- Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. 2010. **Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection.** *J Clin Pathol* 63:322-9.
- Rosty C, Parry S, Young JP. 2011. **Serrated polyposis: an enigmatic model of colorectal cancer predisposition.** *Patholog Res Int* 2011:157073.
- Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP. 2000. **APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits".** *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3352-7.
- Rusu D, Loret S, Peulen O, Mainil J, Dandrifosse G. 2005. **Immunochemical, biomolecular and biochemical characterization of bovine epithelial intestinal primocultures.** *BMC Cell Biol* 6:42.
- Rödel F, Hoffmann J, Grabenbauer GG, Papadopoulos T, Weiss C, Günther K, Schick C, Sauer R, Rödel C. 2002. **High survivin expression is associated with reduced apoptosis in rectal cancer and may predict disease-free survival after preoperative radiochemotherapy and surgical resection.** *Strahlenther Onkol* 178:426-35.
- Rödel F, Reichert S, Sprenger T, Gaipl US, Mirsch J, Liersch T, Fulda S, Rödel C. 2011. **The role of survivin for radiation oncology: moving beyond apoptosis inhibition.** *Curr Med Chem* 18:191-9.
- Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimmer A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. 2008. **Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers.** *Drug Resist Updat* 11:123-51.
- Sadanandam A, Lyssiotis CA, Homicsko K, Collisson EA, Gibb WJ, Wullschleger S, Ostos LC, Lannon WA, Grotzinger C, Del Rio M, Lhermitte B, Olshen AB, Wiedenmann B, Cantley LC, Gray

- JW, Hanahan D. 2013. **A colorectal cancer classification system that associates cellular phenotype and responses to therapy.** Nat Med 19:619-25.
- Sah NK, Khan Z, Khan GJ, Bisen PS. 2006. **Structural, functional and therapeutic biology of survivin.** Cancer Lett 244:164-71.
- Satelli A, Li S. 2011. **Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy.** Cell Mol Life Sci 68:3033-46.
- Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rödel C, Wittekind C, Fietkau R, Martus P, Tschmelitsch J, Hager E, Hess CF, Karstens JH, Liersch T, Schmidberger H, Raab R, Group GRCS. 2004. **Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer.** N Engl J Med 351:1731-40.
- Schachter H. 1986. **Biosynthetic controls that determine the branching and microheterogeneity of protein-bound oligosaccharides.** Biochem Cell Biol 64:163-81.
- Schuhmacher C, Becker I, Oswald S, Atkinson MJ, Nekarda H, Becker KF, Mueller J, Siewert JR, Höfler H. 1999. **Loss of immunohistochemical E-cadherin expression in colon cancer is not due to structural gene alterations.** Virchows Arch 434:489-95.
- Schluter, K.; Gassmann, P.; Enns, A.; Korb, T.; Hempling-Bovenkerk, A.; Holzen, J.; Haier, J. **Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential.** Am. J. Pathol. 2006, 169, 1064-1073
- Sebag-Montefiore D, Stephens RJ, Steele R, Monson J, Grieve R, Khanna S, Quirke P, Couture J, de Metz C, Myint AS, Bessell E, Griffiths G, Thompson LC, Parmar M. 2009. **Preoperative radiotherapy versus selective postoperative chemoradiotherapy in patients with rectal cancer (MRC CR07 and NCIC-CTG C016): a multicentre, randomised trial.** Lancet 373:811-20.
- Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T, Cooper D, Gansler T, Lerro C, Fedewa S, Lin C, Leach C, Cannady RS, Cho H, Scoppa S, Hachey M, Kirch R, Jemal A, Ward E. 2012. **Cancer treatment and survivorship statistics, 2012.** CA Cancer J Clin 62:220-41.
- Singh A, Settleman J. 2010. **EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer.** Oncogene 29:4741-51.
- Smith MI, Deshmukh M. 2007. **Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis requires bax for commitment and Apaf-1 for execution in primary neurons.** Cell Death Differ 14:1011-9.

Somosy Z. 2000. **Radiation response of cell organelles.** *Micron* 31:165-81.

Stauber RH, Mann W, Knauer SK. 2007. **Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential.** *Cancer Res* 67:5999-6002.

Takahashi M, Kuroki Y, Ohtsubo K, Taniguchi N. 2009. **Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core: their functions and target proteins.** *Carbohydr Res* 344:1387-90.

Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J, Jianguo G, Honke K, Matsumoto A. 2006. **Decoding sugar functions by identifying target glycoproteins.** *Curr Opin Struct Biol* 16:561-6.

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF. 2005. **The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia.** *Cancer Res* 65:5996-6000; discussion 6000-1.

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. 2010. **Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:15449-54.

Tay Y, Kats L, Salmena L, Weiss D, Tan SM, Ala U, Karreth F, Poliseno L, Provero P, Di Cunto F, Lieberman J, Rigoutsos I, Pandolfi PP. 2011. **Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs.** *Cell* 147:344-57.

Temraz S, Mukherji D, Shamseddine A. 2014. **Sequencing of treatment in metastatic colorectal cancer: Where to fit the target.** *World J Gastroenterol* 20:1993-2004.

Terao M, Ishikawa A, Nakahara S, Kimura A, Kato A, Moriwaki K, Kamada Y, Murota H, Taniguchi N, Katayama I, Miyoshi E. 2011. **Enhanced epithelial-mesenchymal transition-like phenotype in N-acetylglucosaminyltransferase V transgenic mouse skin promotes wound healing.** *J Biol Chem* 286:28303-11.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. **Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease.** *Cell* 139:871-90.

Thiery JP, Sleeman JP. 2006. **Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:131-42.

Tojkander S, Gateva G, Schevzov G, Hotulainen P, Naumanen P, Martin C, Gunning PW, Lappalainen P. 2011. **A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers.** *Curr Biol* 21:539-50.

Tsanou E, Peschos D, Batistatou A, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. 2008. The E-cadherin adhesion molecule and colorectal cancer. A global literature approach. *Anticancer Res* 28:3815-26.

Valastyan S, Weinberg RA. 2011. **Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms.** *Cell* 147:275-92.

van den Brink M, Stiggelbout AM, van den Hout WB, Kievit J, Klein Kranenbarg E, Marijnen CA, Nagtegaal ID, Rutten HJ, Wiggers T, van de Velde CJ. 2004. **Clinical nature and prognosis of locally recurrent rectal cancer after total mesorectal excision with or without preoperative radiotherapy.** *J Clin Oncol* 22:3958-64.

van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, Kujala P, Haegerbarth A, Stange DE, Begthel H, van den Born M, Guryev V, Oving I, van Es JH, Barker N, Peters PJ, van de Wetering M, Clevers H. 2009. **Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate.** *Cell* 136:903-12.

van Es JH, Clevers H. 2005. **Notch and Wnt inhibitors as potential new drugs for intestinal neoplastic disease.** *Trends Mol Med* 11:496-502.

Vilar E, Gruber SB. 2010. **Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence.** *Nat Rev Clin Oncol* 7:153-62.

Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. **Cancer genes and the pathways they control.** *Nat Med* 10:789-99.

Vonk DT, Hazard LJ. 2010. **Do all locally advanced rectal cancers require radiation? A review of literature in the modern era.** *J Gastrointest Oncol* 1:45-54.

Wang D, Su L, Huang D, Zhang H, Shin DM, Chen ZG. 2011. **Downregulation of E-Cadherin enhances proliferation of head and neck cancer through transcriptional regulation of EGFR.** *Mol Cancer* 10:116.

Wang W, Goswami S, Lapidus K, Wells AL, Wyckoff JB, Sahai E, Singer RH, Segall JE, Condeelis JS. 2004. **Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors.** *Cancer Res* 64:8585-94.

- Watanabe K, Dai X. 2011. **Winning WNT: race to Wnt signaling inhibitors.** Proc Natl Acad Sci U S A 108:5929-30.
- Wei J, Xu G, Wu M, Zhang Y, Li Q, Liu P, Zhu T, Song A, Zhao L, Han Z, Chen G, Wang S, Meng L, Zhou J, Lu Y, Ma D. 2008. **Overexpression of vimentin contributes to prostate cancer invasion and metastasis via src regulation.** Anticancer Res 28:327-34.
- Weinberg RA. 2008. **Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence.** Nat Cell Biol 10:1021-3.
- Whitt JD, Li N, Tinsley HN, Chen X, Zhang W, Li Y, Gary BD, Keeton AB, Xi Y, Abadi AH, Grizzle WE, Piazza GA. 2012. **A novel sulindac derivative that potently suppresses colon tumor cell growth by inhibiting cGMP phosphodiesterase and β -catenin transcriptional activity.** Cancer Prev Res (Phila) 5:822-33.
- Wigley WC, Fabunmi RP, Lee MG, Marino CR, Muallem S, DeMartino GN, Thomas PJ. 1999. **Dynamic association of proteasomal machinery with the centrosome.** J Cell Biol 145:481-90.
- Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. 2009. **Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer.** Curr Cancer Drug Targets 9:307-19.
- Workman P, Al-Lazikani B, Clarke PA. 2013. **Genome-based cancer therapeutics: targets, kinase drug resistance and future strategies for precision oncology.** Curr Opin Pharmacol 13:486-96.
- Yacoub A, Miller A, Caron RW, Qiao L, Curiel DA, Fisher PB, Hagan MP, Grant S, Dent P. 2006. **Radiotherapy-induced signal transduction.** Endocr Relat Cancer 13 Suppl 1:S99-114.
- Yamaguchi H, Condeelis J. 2007. **Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion.** Biochim Biophys Acta 1773:642-52.
- Yamamoto H, Swoger J, Greene S, Saito T, Hurh J, Sweeley C, Leestma J, Mkrdichian E, Cerullo L, Nishikawa A, Ihara Y, Taniguchi N, Moskal JR. 2000. **Beta1,6-N-acetylglucosamine-bearing N-glycans in human gliomas: implications for a role in regulating invasivity.** Cancer Res 60:134-42.
- Yao H, Ashihara E, Strovel JW, Nakagawa Y, Kuroda J, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Hayashi Y, Shimazaki C, Taniwaki M, Strand K, Padia J, Hirai H, Kimura S, Maekawa T. 2011. **AV-65, a novel Wnt/ β -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model.** Blood Cancer J 1:e43.

- Yardley DA. 2013. **Drug resistance and the role of combination chemotherapy in improving patient outcomes.** Int J Breast Cancer 2013:137414.
- Yorio JT, Bhadkamkar NA, Kee BK, Garrett CR. 2012. **A Primer on the Current State-of-the-Science Neoadjuvant and Adjuvant Therapy for Patients with Locally Advanced Rectal Adenocarcinomas.** Int J Surg Oncol 2012:863034.
- Yoshimura M, Ihara Y, Matsuzawa Y, Taniguchi N. 1996. **Aberrant glycosylation of E-cadherin enhances cell-cell binding to suppress metastasis.** J Biol Chem 271:13811-5.
- Zahreddine H, Borden KL. 2013. **Mechanisms and insights into drug resistance in cancer.** Front Pharmacol 4:28.
- Zhang MC, Hu CP, Chen Q. 2006. **Effect of down-regulation of survivin gene on apoptosis and cisplatin resistance in cisplatin resistant human lung adenocarcinoma A549/CDDP cells.** Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 28:408-12.
- Zhang S, Wang X, Iqbal S, Wang Y, Osunkoya AO, Chen Z, Shin DM, Yuan H, Wang YA, Zhou HE, Chung LW, Ritenour C, Kucuk O, Wu D. 2013. **Epidermal growth factor promotes protein degradation of epithelial protein lost in neoplasm (EPLIN), a putative metastasis suppressor, during epithelial-mesenchymal transition.** J Biol Chem 288:1469-79.
- Zhao Y, Sato Y, Isaji T, Fukuda T, Matsumoto A, Miyoshi E, Gu J, Taniguchi N. 2008a. **Branched N-glycans regulate the biological functions of integrins and cadherins.** FEBS J 275:1939-48.
- Zhao YY, Takahashi M, Gu JG, Miyoshi E, Matsumoto A, Kitazume S, Taniguchi N. 2008b. **Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer.** Cancer Sci 99:1304-10.
- Schluter, K.; Gassmann, P.; Enns, A.; Korb, T.; Hempling-Bovenkerk, A.; Holzen, J.; Haier, J. **Organ-specific metastatic tumor cell adhesion and extravasation of colon carcinoma cells with different metastatic potential.** Am. J. Pathol. 2006, 169, 1064-1073